

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Tibouchina urvilleana* (DC.) Cogn.  
PARA A REVEGETAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS  
NA ILHA DE SANTA CATARINA.**

**GILSON ANTONIO MILDE**

**Trabalho apresentado como  
um dos requisitos para  
obtenção do grau de  
Engenheiro Agrônomo pela  
Universidade Federal de Santa  
Catarina.**

**FLORIANÓPOLIS  
1998**

R 209

Ex. 1

**GILSON ANTONIO MILDE**

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Tibouchina urvilleana* (DC.) Cogn.  
PARA A REVEGETAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS  
NA ILHA DE SANTA CATARINA.**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Maria Leonor Del'Rei**

---

**Eng<sup>o</sup>. Agrônomo Afonso Voltolini**

---

**Prof<sup>o</sup> Ênio Luiz Pedrotti  
(Orientador)**

138868

## **IDENTIFICAÇÃO**

**Acadêmico: Gilson Antonio Milde**  
**Nº Matrícula: 9418617-0**

**Orientador: Prof. Ênio Luiz Pedrotti**

**Local de Estágio: Universidade Federal de Santa Catarina**  
**Centro de Ciências Agrárias**  
**Departamento de Fitotecnia**  
**Laboratório de Bioquímica e Morfogênese Vegetal**

**Área: Fitotecnia - Micropropagação de plantas**

**Período: 01 de Março a 30 de Agosto de 1998.**

## **Agradecimentos**

**Aos meus pais e amigos.**

**“Não é pobre aquele que tem menos, mas aquele que deseja mais; nem rico aquele que mais possui, e sim aquele que ambiciona mais.”**

**Sêneca.**

## ÍNDICE

### Página

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. IMPORTÂNCIA SOCIO-ECONÔMICA DA ESPÉCIE CULTIVADA .....</b>	<b>3</b>
<b>3. CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS.....</b>	<b>5</b>
3.1. ASPECTOS GERAIS .....	5
3.2. MICROPROPAGAÇÃO.....	6
3.2. SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO .....	8
3.3. ESTÁGIOS DA MICROPROPAGAÇÃO .....	9
3.4. MEIOS DE CULTURA.....	17
3.4.1. Componentes dos Meios de Cultura .....	19
3.4.2. Preparação do Meio de Cultura.....	22
3.5. SELEÇÃO DA PLANTA MATRIZ.....	12
3.6. SELEÇÃO E COLETA DO EXPLANTE .....	13
3.7. CONTROLE PREVENTIVO DE CONTAMINAÇÕES.....	14
3.8. ISOLAMENTO E INOCULAÇÃO DE EXPLANTES .....	16
3.9. CONDIÇÕES AMBIENTAIS DE INCUBAÇÃO .....	23
3.10. REPICAGEM.....	24
3.11. TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO.....	25
<b>4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO DE PESQUISA SOBRE A MICROPROPAGAÇÃO DE <i>TIBOUCHINA URVILLEANA</i> (DC.) COGN. ....</b>	<b>28</b>
4.1. TÍTULO.....	28
4.2. INTRODUÇÃO.....	29
4.3. OBJETIVO.....	30
4.4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
4.4.1. Meios de Cultura .....	33

4.4.2. Coleta do Explante .....	30
4.4.3. Desinfestação do Explante .....	31
4.4.4. Isolamento dos Meristemas .....	31
4.4.5. Condições Ambientais de Incubação .....	33
4.4.6. Repicagem.....	35
4.4.7. Viabilidade das Sementes de <i>Tibouchina urvilleana</i> e o seu comportamento in vitro. ....	36
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
4.6. CONCLUSÕES.....	45
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>46</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>47</b>
ANEXOS 1. ....	47
Classificação taxonômica:.....	47
Nomes populares: .....	47
Descrição morfológicas (conforme Guimarães (1997) : .....	47
Informações Adicionais:.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>50</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Soluções estoque dos sais de Murashige e Skoog (1962) para a produção dos meios de cultura. ....	19
Tabela 2. Percentagem de meristemas laterais de <i>Tibouchina urvilleana</i> (DC) Cogn. contaminados por fungos após a desinfestação. ....	39
Tabela 3. Percentagem de meristemas laterais de <i>Tibouchina urvilleana</i> em três níveis de oxidação: baixo, médio e alto, de acordo com a concentração de sais do meio de cultura MS. ....	40
Tabela 4. Percentagem média de regeneração de plântulas a partir do cultivo <i>in vitro</i> de meristemas laterais de <i>Tibouchina urvilleana</i> (DC), após 56 dias de cultivo, de acordo com as concentrações de BAP (0, 1, 2 e 4 mg/l). ....	41
Tabela 5. Altura média dos explantes originados de diferentes tipos de explantes: apical, médio e basal aos 45 dias de cultivo em meio MS. ....	42
Tabela 6. Viabilidade das sementes <i>T. urvilleana</i> (DC): Germinação total sob condições controladas (26°C, 16/8 h luz). ....	43



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Percentagem total de germinação de sementes <i>in vitro</i> de <i>Tibouchina urvilleana</i> aos 12 dias da inoculação em meios de cultura com concentrações de BAP (0, 1, 2 e 4 mg/l).....</b>	<b>44</b>
---	-----------

## **1. Introdução**

A Ilha de Santa Catarina vem sofrendo dois processos distintos de ocupação: o crescimento urbano da própria cidade de Florianópolis, sede política, administrativa e cultural do Estado de Santa Catarina, e a descoberta e crescimento do turismo, sua maior vocação, com a ocupação e urbanização de diversos núcleos de pescadores.

Uma breve análise do processo de ocupação na Ilha mostra que fatores como: a velocidade do desenvolvimento econômico, demográfico e espacial do meio se refletem em um crescimento urbano acelerado, resultando numa urbanização anárquica e destrutiva. Desta forma encontramos mais de 250.000 habitantes no município de Florianópolis e mais do dobro da população durante a alta estação (verão), concentrando-se especialmente em alguns balneários turísticos.

A heterogeneidade de ecossistemas litorâneos na zona costeira da Ilha de Santa Catarina leva a uma grande diversidade do meio e de suas paisagens. Eles se constituem a partir de duas estruturas de base: aquelas situadas ao longo da linha da costa ( mangues, praias, promontórios e estuários ) e aquelas situadas na periferia da linha costa ( dunas e restingas ). A partir do mapeamento destes ecossistemas foi possível estabelecer o seu atual estado de preservação. A situação constatada é dramática, em razão da degradação constante a qual eles estão submetidos. Apesar de 42 % da área da ilha ser de preservação permanente, a zona urbana avança progressivamente sobre alguns ecossistemas e muitos deles já estão completamente degradados (Santiago 1996).

A cobertura vegetal original encontra-se totalmente alterada. A vegetação do litoral, mangues, dunas e restingas estão sensivelmente transformadas. Em algumas praias da ilha, as águas estão poluídas e foram consideradas impróprias para o banho, como

aquelas situadas nas proximidades do centro de Florianópolis. As dunas estão igualmente em vias de destruição. Os casos mais críticos concernem as dunas do Campeche e Ingleses, que estão sendo invadidas por loteamentos clandestinos.

Apesar de um prognóstico desanimador, ocorre uma crescente preocupação por parte da sociedade e de profissionais especializados, com a degradação da diversidade biológica concomitantemente do meio ambiente, exigindo que sejam buscadas novas técnicas para a sua conservação.

Na tentativa de gerar propostas para a preservação e repovoamento destas áreas degradadas com plantas nativas, a cultura de tecidos vegetais pode ser uma técnica valiosa em estudos sobre o comportamento *in vitro* das espécies nativas destas regiões degradadas.

Neste sentido o objetivo deste trabalho é desenvolver os processos básicos para a assepsia, a escolha dos meios de cultura e a introdução de meristemas *in vitro* da *Tibouchina urvilleana* (DC.) Cogn., uma espécie nativa que tem mostrado potencialidades como fixadora de dunas e ornamental.

## **2. Importância Socio-econômica da Espécie Cultivada**

As dunas foram feições naturais da maioria das praias arenosas do mundo, as quais recebem contínuos aportes de areias, levados pelos ventos dominantes. A formação das dunas é devido à interação do vento, areia e plantas. O vento que transporta a areia seca ao encontrar a vegetação, perde a força, depositando a areia. Concomitantemente, as plantas através das suas raízes ajudam na fixação da areia, auxiliando no crescimento adicional das dunas (Cordazzo & Seelinger 1995; Santiago 1996).

O principal papel desempenhado pelos sistemas de dunas costeiras é a manutenção e preservação da integridade da morfologia da costa, pois agem como barreiras dinâmicas contra a ação de ondas e tempestades. Além disso, evitam o transporte de areia e o soterramento das áreas vizinhas habitadas (Cordazzo & Seelinger 1995; Santiago 1996). Entretanto, devido a especulação imobiliária, vem ocorrendo uma grande destruição das dunas costeiras e da sua vegetação. Desta forma, sem esta barreira natural para conter as ressacas, a força das águas destrói as construções e estradas litorâneas, além de soterrar pastagens, vias de rodagem e casas pelo movimento da areia.

O projeto dunas, coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Margarida Matos de Mendonça e com apoio do CNPq e UFSC, vem estudando a 6 anos a diversidade dos fungos micorrízicos vesículo-arbúsculares (FMA) nos diferentes estágios sucessionais deste ecossistema na Ilha de Santa Catarina, com o objetivo de desenvolver um processo de estabilização a partir de espécies nativas de FMA e de vegetais das dunas. Mais recentemente este projeto avaliou a população e a diversidade dos FMA na rizosfera de algumas espécies vegetais predominantes nas dunas móveis das dunas das praias da Joaquina, Campeche e Santinho.

A partir dos dados coletados até o momento, pode-se saber a diversidade dos

FMA, o qual é de maior abundância na rizosfera dessas plantas nativas das dunas. Contudo, para concretizar estes estudos na geração de uma tecnologia para a estabilização de dunas móveis, são necessários estudos mais detalhados a fim de mensurar a efetividade destes FMA e as suas interações. Sendo fundamental para isto, um grande número de plantas, que apresentem uma uniformidade de tamanho da parte aérea, das raízes e preferencialmente possuam o mesmo genótipo, para avaliar o efeito de diferentes isolados de FMA com a espécie vegetal hospedeira.

Dentre as espécies vegetais que ocorrem naturalmente nestes sistemas de dunas selecionou-se para o presente estudo a *Tibouchina urvilleana*. Esta escolha deve-se principalmente ao potencial de utilização desta espécie para a fixação de dunas, embasando-se em estudos preliminares de interações com FMA já realizados e principalmente, no uso corrente desta espécie como planta ornamental em alguns países, Estados Unidos, Itália, Alemanha e Austrália (Heitz 1986; Köchel & Köckel 1987; Internet 1998).

*Tibouchina urvilleana* é nativa do Brasil onde tem ocorrência relatada para as regiões litorâneas do Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo e Santa Catarina. Neste último estado, é comum na Ilha de Santa Catarina onde ocorre das restingas até as dunas. Esta espécie não vem sendo valorizada como planta ornamental no Brasil.

### 3. Revisão Bibliográfica sobre a Cultura de Tecidos Vegetais

#### 3.1. Aspectos Gerais

---

A biotecnologia inclui uma multiplicidade de técnicas e processos de utilização de sistemas celulares de plantas, animais e microorganismos para geração de bens ou serviços de interesse. Num sentido mais restrito a biotecnologia compreende a associação de técnicas mais sofisticadas de biologia molecular e celular, engenharia genética e manipulações celulares *in vitro*. De modo geral, pode ser dividida em três grandes áreas: a biotecnologia de microorganismos, a animal e a vegetal. A biotecnologia vegetal reúne várias técnicas de cultura de tecidos na busca de produtos vegetais de melhor qualidade.

A cultura de tecidos *in vitro* abrange um grupo de técnicas através das quais se cultiva células, tecidos ou órgãos num ambiente asséptico, em meios de cultura de composição química conhecida e incubados em condições ambientais controladas. Essas técnicas se baseiam no princípio postulado por Haberlandt (1902) *apud* Roca & Mroginski (1991), da totipotencialidade celular, isto é, uma célula vegetal tem potencial genético para reproduzir um indivíduo completo. Esta idéia, associada com a hipótese do balanço hormonal, proposta por Skoog e Miller (1957), possibilitou o estudo da morfogênese *in vitro* e a sua aplicação prática. A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, em função do tamanho dos propágulos utilizados, é indiscutivelmente, a sua aplicação mais concreta e de maior impacto da cultura de tecidos.

Os objetivos da utilização do cultivo *in vitro* de tecidos vegetais foram numerosos e diferentes, tais como: a) estudos básicos de fisiologia, genética, bioquímica e ciências afins; b) bioconservação e produção de compostos úteis; c) incremento da variabilidade

genética; d) obtenção de plantas livres de patógenos; e) propagação de plantas; e f) conservação de germoplasma (Roca & Mroginski 1991).

O estabelecimento da cultura de tecidos, ou seja, a separação do explante e as operações relacionadas com a sua incubação *in vitro*, dependerá em grande parte do tipo de explante e do sistema de cultivo que será utilizado, que por sua vez dependerá do objetivo almejado. Em outras palavras, as técnicas utilizadas para cultivar protoplastos não são exatamente as mesmas que se usam para cultivar meristemas; do mesmo modo, um determinado sistema de cultivo pode ser de grande utilidade para um objetivo e pode não ser útil para outro (Roca & Mroginski 1991).

### **3.2. Micropropagação**

---

A técnica de micropropagação pode ser definida como o desenvolvimento de novas plantas a partir de pequenos propágulos (explantes), num meio artificial sob condições assépticas. A micropropagação clonal representa a otimização de um processo de propagação vegetativa, ou seja, implica que cada uma das plântulas que se produz pode crescer e ser fenotípica e genotipicamente idêntica a planta matriz da qual se deriva. A garantia do sucesso da micropropagação está na escolha do problema certo, ou seja, aquele onde efetivamente esta técnica possa contribuir tanto para a solução do problema como para o melhor conhecimento da espécie em consideração (Grattagaglia & Machado 1990; Krikorian 1991; Fachinello *et al.* 1994).

A propagação através da cultura de tecidos foi desenvolvida com Morel & Martin (1952) *apud* Caldas *et al.* (1990), estes demonstraram uma de suas utilidades, a eliminação de vírus da Dahlia Stock. Embora o cultivo de tecidos de plantas teve o primeiro sucesso com White (1934) *apud* Evans *et al.* (1993), a primeira aplicação comercial da micropropagação foi feita por Morel (1960), ao multiplicar orquídeas através de ápices caulinares e de protocormos (estruturas que se diferenciavam em embriões). A sucessiva divisão destes protocormos acelerou o processo de propagação de orquídeas. Atualmente a

micropropagação a nível comercial é uma realidade em diversos países, principalmente na Europa e nos Estados Unidos. Os laboratórios comerciais surgiram, em grande parte, agregados aos viveiros como iniciativa das próprias companhias tradicionalmente produtoras de mudas, a fim de atender as suas necessidades de material de propagação vegetativa. No Brasil essa atividade é recente. A nível comercial, apenas algumas empresas de produção de plantas ornamentais e reflorestadoras fazem uso desta técnica (Vaz 1986).

A propagação clonal *in vitro* possui uma série de vantagens sobre as práticas convencionais de propagação assexual, tais como: a) incremento acelerado do número de plantas derivadas por genótipo; b) redução do tempo de multiplicação; c) possibilidade de multiplicar grandes quantidades de plantas por área; d) maior controle sobre a sanidade do material que se propaga, usualmente sendo livres de bactérias e fungos, em alguns casos sendo livres de vírus; e) possibilidade de multiplicar rapidamente uma variedade da qual existem poucos indivíduos; f) uso de pequena quantidade de tecido vegetal como explante inicial; g) possibilidade de multiplicação de espécies vegetais de difícil propagação pelo método convencional; h) facilidade de intercâmbio internacional de material vegetal sem o risco de introduzir doenças e menos restrições alfandegárias; i) em muitos casos a micropropagação é independente das estações do ano na produção de material vegetativo (novas plântulas) (Evans *et al.* 1983; Augé *et al.* 1989; Villalobos & Thorpe 1991).

A grande vantagem da micropropagação sobre os métodos convencionais de propagação é a produção de um elevado número de plantas que podem ser obtidas a partir de um único indivíduo, em um espaço de tempo relativamente curto e numa pequena área.

Entre as desvantagens da micropropagação sobre os métodos convencionais pode-se citar: a) a necessidade de equipamentos especiais; b) o valor relativamente caro dos propágulos por causa dos métodos intensivos utilizados; c) os métodos especiais devem ser desenvolvidos para cada espécie na procura de um resultado de propagação ótimo; d) as plântulas inicialmente são muito pequenas; e) a possibilidade da produção de variantes somaclonais é alta; f) algumas espécies vegetais podem se multiplicar ou se propagar por meios vegetativos convencionais, entretanto, estas plantas nem sempre respondem bem a micropropagação (Krikorian 1991).



### 3.3. Sistemas de micropropagação

---

577.23

Os sistemas de micropropagação podem ser:

- a) Pela multiplicação através da proliferação de gemas axilares.

A proliferação de gemas inclui o isolamento e a inoculação de segmentos nodais contendo gemas vegetativas axilares, a quebra da dominância apical e a multiplicação de partes aéreas com a aplicação de citocininas ao meio de cultura. As gemas axilares que naturalmente se formam nas inserções das folhas foram estimuladas a crescer, dando origem a novas partes aéreas, que por sua vez, repetem o mesmo processo. As brotações podem ser separadas em microestacas para o enraizamento *in vitro* ou *in vivo*. Este procedimento pode originar respostas de propagação massal em progressão geométrica. Por ser um sistema de organogênese direta, a possibilidade de gerar variantes somaclonais é reduzida, isso faz com que seja o sistema preferido para a micropropagação. Como exemplos de utilização desta técnica podemos citar: a propagação clonal do abacaxi, morango, batata e amora (Flick *et al.* 1983; George 1993).

- b) Pela multiplicação através da indução de gemas adventícias por:

- b.1) Multiplicação direta.

A indução de gemas adventícias por organogênese direta refere-se a formação direta de gemas a partir de tecidos que apresentam potencial morfogenético na planta *in vivo*, mas que em geral não se expressa. Estes tecidos incluem o câmbio vascular, base do pecíolo em dicotiledôneas e segmentos de raízes, entre outros. Como exemplo dessa técnica de propagação podemos citar: a violeta africana, algumas espécies de begônias e o maracujá (Flick *et al.* 1983; Krikorian 1991).

- b.2) Organogênese indireta.

Ocorre quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo (desdiferenciação das células parenquimáticas). A partir de células não organizadas do calo, inicia a organização de meristemóides, originando gemas adventícias que se desenvolvem em novas partes aéreas. As multiplicações sucessivas podem ser obtidas pela subdivisão do calo e manutenção de um sistema adventício, ou alternando-se o processo para a proliferação axilar sem a passagem por calo (George 1993; Guerra 1994).

Sistemas de micropropagação que passam por uma fase de formação de calo foram

geneticamente mais instáveis, pois nessa fase as células ficam mais sujeitas a alterações cromossômicas causadas pela ação dos fitorreguladores, originando variantes somaclonais (muitas vezes indesejados) ou plantas quiméricas. Geralmente a passagem pela fase de calo é necessária ao se utilizar explantes em estágio avançado de diferenciação, como folhas, câmbio vascular, meristemas florais ou partes reprodutivas. Como exemplo dessa técnica podemos citar: a (George & Sherrington 1984).

c) Pela multiplicação através de embriogênese somática.

A embriogênese somática é a formação de embriões a partir de células somáticas. Também pode ocorrer direta ou indiretamente. É chamada direta quando os embriões se originam diretamente de tecidos, sem a proliferação de calo e indireta quando o calo é formado antes do desenvolvimento dos embriões. Estes calos se formam sobre sua superfície. A grande maioria dos sistemas de embriogênese somática se dá pela via indireta (Schultheis *et al.* 1990).

A embriogênese somática apresenta enorme potencial de multiplicação a custos menores que os outros sistemas de micropropagação porque podem ser formadas grandes quantidades de embriões em suspensões de células embriogênicas com mínima manipulação manual e espaço físico. Embora, as limitações estão relacionadas com a introdução de variabilidade genética indesejável e a obtenção de um sistema de embriogênese reproduzível em escala comercial. A vantagem de se utilizar a embriogênese somática vai depender da espécie a ser propagada (Flick *et al.* 1983;).

A iniciação e o desenvolvimento de embriões somáticos em sistemas *in vitro* foi obtida quase simultaneamente por Steward *et al.* (1958) e por Reinert (1959) em *Daucus carota* L.. No final dos anos 70, a ocorrência deste padrão morfogenético já era relatada para 32 famílias, 81 gêneros e 132 espécies vegetais (Guerra 1994). Como exemplos cita-se: o palmito, o cacaueiro, o cafeeiro e espécies de citros.

### **3.4. Estágios da Micropropagação**

---

A propagação de plantas através da cultura de tecidos é obtida por uma sequência de estágios, cada qual com as suas necessidades específicas em relação a composição do

meio de cultura, o tipo e o balanço dos reguladores de crescimento e condições físicas de incubação (intensidade luminosa, temperatura e fotoperíodo). Em condições laboratoriais cada estágio deve ser identificado e as condições ótimas devem ser estabelecidas. Murashige (1974) definiu três estágios fundamentais, já o Debergh & Maene (1981) incluíram o estágio 0 e subdividiram o estágio III em a e b, posteriormente George & Sherrington (1984) isolaram o estágio III b no estágio IV, tudo isso levou a uma seqüência de cinco etapas:

Estágio 0 : É a fase preparativa. Consiste em selecionar e cultivar a planta matriz doadora de explantes em condições especiais de sanidade para obter propágulos com menor incidência de microorganismos contaminantes. Se necessário, pode-se modificar as condições de fotoperíodo e temperatura, ou aplicar a essa planta fitorreguladores do grupo das giberelinas e auxinas, alterando com isto a sua condição fisiológica (Krikorian 1991; Fachinello *et al.* 1994; Guerra 1994). Além disso, faz-se tratamentos fitossanitários com produtos químicos, como fungicidas, bactericidas, etc.

Estágio I : Consiste na iniciação e/ou no estabelecimento de uma cultura asséptica, na qual procede-se o cultivo inicial ou primário.

O objetivo deste estágio é a definição do tipo de explantes a ser utilizado, o estabelecimento de culturas isentas de microorganismos contaminantes, a obtenção de altos índices de sobrevivência e de rápido crescimento dos explantes. Inicia-se com a seleção dos explantes mais adequados, passa pela desinfestação do material e termina com a obtenção de uma cultura livre de contaminantes e suficientemente adaptados às condições *in vitro*.

Neste estágio torna-se necessário monitorar e controlar as reações de oxidação que ocorrem: a) pela oxidação de compostos fenólicos presentes no explante, como resposta ao ferimento provocado pela excisão de um órgão ou tecido; b) pela síntese de compostos mono e poliméricos por parte do explante. Sabe-se que, a incubação destas culturas na ausência da luz por alguns dias pode inibir os processos oxidativos. O sucesso dessa etapa é determinado pelo estado fisiológico e fitossanitário da planta matriz, pelo processo de descontaminação, pela idade fisiológica, estágio de desenvolvimento e tamanho do explante (Grattapaglia & Machado 1990; Debergh & Read 1991; Fachinello *et al.* 1994).

Estágio II : é a etapa de multiplicação dos propágulos, fundamentado na divisão e diferenciação celular.

O objetivo é produzir um grande número de brotações (microestacas) para o enraizamento através de sucessivos subcultivos, no menor espaço de tempo possível. Em muitos casos, estágios intermediários de calo estão envolvidos, contudo, quando o objetivo é a manutenção da conformidade clonal, a passagem por estágios de calo deve ser evitada, tendo em vista a possibilidade de ocorrência de variações somaclonais. Neste estágio deve-se determinar o número e intervalo de subcultivos, bem como determinar e otimizar a taxa de multiplicação, ou seja, o número de gemas ou de eixos caulinares que podem ser obtidos a partir de cada inóculo nos subcultivos. É importante observarmos alguns aspectos qualitativos como uma taxa média satisfatória de multiplicação e que haja o mínimo de variação entre os explantes. A qualidade e a homogeneidade das partes aéreas vão influenciar na fase de enraizamento (Krikorian 1991; Fachinello *et al.* 1994).

As condições ambientais neste estágio relacionam-se com a temperatura, cuja faixa ótima está entre 22 e 27°C para as plantas de clima temperado e tropical, respectivamente. O período de luz deve permanecer em torno de 16 a 18 horas em intensidades luminosas médias de  $5 \mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$ .

Estágio III : Corresponde ao enraizamento das microestacas produzidas. Nesta fase busca-se a indução e iniciação radicular, o alongamento e a preparação para a aclimatização.

O objetivo deste estágio é preparar para a conversão das condições heterotróficas para autotróficas (Krikorian 1994). As estratégias deste estágio incluem eventuais inserções no meio de cultura de: a)  $\text{GA}_3$  para induzir o alongamento dos eixos caulinares; b) AIB para induzir a iniciação radicular; c) carvão ativado para favorecer a iniciação radicular. Reduções nas concentrações dos sais e das fontes de carboidratos do meio de cultura podem trazer benefícios à iniciação radicular, bem como facilitar o processo de aclimatização (Guerra 1994).

Para promover o enraizamento das partes aéreas a um custo menor (30 a 60% do custo de uma planta micropagada) muitos laboratórios preferem fazê-la *ex-vitro* (George 1993).

Estágio IV : é a etapa de aclimatização, isto é, transferência das plantas para as condições de casa de vegetação. É a fase mais crítica, pois as plantas passam de um ambiente artificial totalmente controlado para as condições naturais. O principal objetivo é

diminuir ao máximo as perdas que ocorrem principalmente pela desidratação dos tecidos da microplanta. A mudança para esse estágio, deve ser gradual. O emprego de casa-de-vegetação, túneis plásticos, sistemas de nebulização e de antitranspirantes deve ser considerado para cada situação, tendo em vista que as plantas neste estágio normalmente não apresentam estômatos funcionais e as suas folhas têm reduzida capacidade de formação de cutículas cerosas protetoras. Este esquema pode ser modificado de acordo com as características de cada espécie, adicionando-se uma fase de alongamento das partes aéreas antes do enraizamento ou subtraindo-se a etapa de enraizamento e utilizando as partes aéreas como microestacas (Fachinello *et al.* 1994).

De maneira geral este estágio inicia-se com a retirada das plântulas dos frascos e a cuidadosa remoção por lavagem dos resíduos de meio de cultura gelatinoso que estão junto ao sistema radicular. Um segundo passo consiste em repicar estas plântulas para bandejas de isopor contendo um substrato autoclavado, cuja composição foi previamente determinada. O terceiro passo consiste em manter estas bandejas, por períodos de até 15 dias, em sala de cultura cuja a temperatura, a duração e a intensidade luminosa sejam controladas. O próximo passo consiste em transferir esta bandeja para uma casa-de-vegetação com sistema de nebulização intermitente por períodos médios de 15 a 30 dias. Posteriormente, pode-se repicar estas plântulas para sacos plásticos contendo uma mistura convencional (não autoclavada de solo argiloso, arenoso e matéria orgânica) e mantê-las em condição de ripado ou cobertura com sombrite que permitem passar em torno de 50 % da luminosidade. Por fim, procede-se a retirada gradual da cobertura para que as mudas sejam submetidas às condições ambientais normais que se verificam após o transplante para o local definitivo. É importante salientar que determinadas seqüências destas operações podem ser excluídas ou ainda podem ser estabelecidos outros procedimentos específicos para cada espécie a ser estudada num laboratório de micropropagação (Guerra 1994).

#### **3.4.1. Seleção da Planta Matriz**

O comportamento da cultura *in vitro* é influenciado pelo estado fisiológico e fitossanitário da planta matriz. Os melhores explantes são obtidos de plantas matrizes bem

nutridas, sem sintomas de deficiência hídrica e em fase ativa de crescimento após o final da fase de dormência ou em plantas em fase juvenil. A idade fisiológica tem grande influência na morfogênese. Quanto menos diferenciado for o tecido melhor será a resposta *in vitro*. Os meristemas apicais e axilares extraídos próximo ao ápice dos ramos têm mostrado as melhores respostas (Villalobos & Thorpe 1991).

Como a condição fitossanitária da planta matriz determina a facilidade de descontaminação do explante, é fundamental mantê-la em ambiente limpo, como uma casa de vegetação ou câmara de crescimento, envasadas e irrigando somente o substrato. Na casa de vegetação o controle de insetos e microorganismos é possível através de aplicações de inseticidas, fungicidas e bactericidas. Além disso, na casa de vegetação é possível controlar o fotoperíodo, a intensidade luminosa e a temperatura a fim de estimular novas brotações ou simular períodos de vernalização. Este sistema adapta-se à plantas herbáceas e arbustivas, mas torna-se bastante complicado quando se trata de uma planta arbórea. Outros pré-tratamentos como o estiolamento ou a aplicação de fitorreguladores podem ser dados a planta matriz para obter novas brotações livres de patógenos (Grattapaglia & Machado 1990).

### 3.4.2. Seleção e Coleta do Explante

Os explantes são segmentos de um tecido ou de um órgão que foram isolados da planta matriz com a finalidade de serem cultivados *in vitro* sob determinadas condições. Pode-se utilizar como explantes: segmentos de raízes, folhas, entrenós, segmentos nodais, meristemas apicais e axilares, gemas e tecidos reprodutivos (Villalobos & Thorpe 1991).

O explante *in vitro* apresenta uma resposta que varia de acordo com o seu estado de desenvolvimento, a sua idade ontogenética, a época do ano que se realiza o cultivo, os pré-tratamentos aplicados e as condições da planta matriz (Roca & Mroginski 1991).

“Teoricamente, qualquer tecido pode ser utilizado como explante, em vista da totipotência das células vegetais. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a

totipotência.” e que “As gemas apicais às vezes apresentam maior capacidade de crescimento do que gemas axilares que estão sob o efeito da dominância apical. Isto é comum em plantas herbáceas, ornamentais e olerícolas, enquanto que o contrário, em geral, vale para espécies arbóreas.” (Grattapaglia & Machado 1990)

Durante a coleta do material deve-se manter o maior nível de assepsia possível utilizando instrumentos limpos e esterilizados. O material coletado é colocado em sacos plásticos ou frascos de vidro para evitar o dessecamento, é identificado e imediatamente levado ao laboratório (Grattapaglia & Machado 1990).

O tamanho do explante depende do objetivo da micropropagação. Se o objetivo for eliminar algum microorganismo sistêmico como vírus, bactérias ou micoplasmas quanto menor o explante isolado ou quanto mais isolado das regiões vascularizadas subjacentes, maior a chance de sucesso. Por outro lado, se o objetivo for somente o de propagar é melhor começar a cultura com ápices ou segmentos caulinares que contêm gemas axilares (Grattapaglia & Machado 1990).

Quanto menor o explante menor será a chance de conter microorganismos contaminantes, porém explantes muito pequenos algumas vezes não conseguem crescer, regenerar plantas completas ou demoram muito a fazê-lo e requerem o uso de meios mais complexos (Roca & Mroginski 1991).

“No caso de recuperação de plantas livres de doenças deve-se procurar o tamanho de explante ideal que esteja livre dos microorganismos ao mesmo tempo que consiga se estabelecer e crescer uma vez isolado.” (Grattapaglia & Machado 1990).

É importante que os explantes sejam coletados somente um pouco antes de iniciar o cultivo, para evitar que ocorra desidratação, oxidação ou morte dos mesmos, se este período se prolongar.

### **3.4.3. Controle Preventivo de Contaminações**

A associação explante-meio e as condições físicas em que normalmente se incubam os cultivos formam um ambiente propício para a proliferação de microorganismos,

como fungos e bactérias, os quais podem destruir estes cultivos ao competir com o explante pelos nutrientes do meio de cultura ou modificar este meio com seus metabólitos secundários. Evitar as contaminações é um aspecto básico para o sucesso do cultivo, não somente durante o estabelecimento da cultura mas também na posterior incubação e a manipulação (Roca & Mroginski 1991).

A assepsia inclui uma série de procedimentos que vão desde a esterilização dos meios de cultura e dos instrumentos até a desinfestação dos explantes. A esterilização dos meios de cultura é realizada, geralmente por uma autoclavagem durante 15 a 20 minutos, à uma temperatura de 121°C e a pressão de 1 a 1,5 atm (Handro & Floh 1990).

As substâncias com ação germicida comumente utilizadas na desinfestação dos explantes são o etanol e o hipoclorito de sódio e cálcio. “As concentrações das soluções desinfestantes podem variar muito, assim como as combinações dos princípios ativos desinfestantes e os tempos de exposição. Considerando a consistência do tecido a ser desinfestado, manipula-se a concentração da solução e tempo de exposição de maneira inversamente proporcional. O etanol geralmente é utilizado a 70 a 80 %, uma vez que acima desta concentração é menos eficiente e pode desidratar rapidamente os tecidos. Além de ação germicida, o etanol é surfactante, facilitando a ação dos outros produtos. O tempo de exposição dos tecidos ao etanol é em geral, de algumas dezenas de segundos, mas, conforme a consistência, pode chegar a alguns minutos.” (Grattapaglia & Machado 1990). A solução de hipoclorito de sódio (NaCl) em concentrações de 1 a 3 % é muito eficiente como germicida e agente oxidante. Supõe-se que possui a vantagem de ser facilmente retirado das superfícies eliminando, assim, resíduos oxidantes indesejáveis (Roca & Mroginski 1991).

Pode-se adicionar às soluções a base de cloro algumas gotas de um agente tensioativo (como o Tween 20 ou detergente de uso domiciliar), para melhorar o contato destas com os tecidos.

Após o tratamento com as soluções desinfestantes é necessário lavar o material com água destilada ou deionizada e autoclavada para remover os restos dos produtos. A lavagem é feita com diversas águas sucessivas (3-5), observando que o volume de água utilizado seja compatível com a quantidade de material que está sendo desinfestado (Grattapaglia & Machado 1990; Roca & Mroginski 1991).



Contaminantes como bactérias e esporos de fungos, encontram-se dispersos principalmente no ar, por isto é utilizada a câmara de fluxo laminar de ar onde o ambiente permanece asséptico durante o trabalho. A operação de desinfestação, bem como o isolamento e as repicagens devem ser realizadas em câmara de fluxo laminar em condições assépticas, utilizando material previamente esterilizado. A fim de prevenir eventuais contaminações durante as operações, deve-se respeitar algumas regras:

- a) antes de iniciar o trabalho é necessário desinfetar a mesa e as paredes da câmara de fluxo com algodão embebido em etanol 70 % (v/v);
- b) todo material que for introduzido na câmara deve ser borrifado com etanol 70 % (v/v);
- c) o operador deve lavar as mãos e antebraços com sabão e enxaguá-los com etanol 70 % (v/v), usar avental limpo, prender os cabelos ou usar touca e usar máscara;
- d) os instrumentos metálicos usados devem ser previamente flambados com etanol 96 %, o material de vidro deve ser esterilizado;
- e) fazer a transferência e dissecação do material o mais próximo possível da chama do bico de busen (lamparina), evitar exposição prolongada dos explantes e dos meios de cultura em recipientes abertos (Roca & Mroginski 1991).

#### **3.4.4. Isolamento e Inoculação de Explantes**

O isolamento deve ser realizado em câmara de fluxo laminar, em ambiente asséptico. A manipulação do explante nesta primeira fase determina, em parte, a sua sobrevivência e o seu posterior desenvolvimento. A operação de isolamento do explante deve ser rápida e precisa para evitar a desidratação dos tecidos causada pelo fluxo de ar da câmara e do calor emitido pela fonte luminosa do microscópio estereoscópico. Os instrumentos necessários ao isolamento são pinças, bisturis e estiletes. Todos devem ser flambados após imersão em etanol absoluto e devem ser utilizados somente quando estiverem em temperatura ambiente.

É muito importante que o operador tenha muita destreza manual e rapidez para

isolar o explante com o mínimo de dano possível e para que seja rapidamente transferido para o meio de cultura.

Durante o isolamento dos explantes pode ocorrer a oxidação de compostos fenólicos que são liberados pelas células danificadas com o corte. Os produtos da oxidação são tóxicos e se difundem no meio de cultura escurecendo-o. Este problema pode ser reduzido adotando-se medidas como: a) utilizar substâncias antioxidantes como ácido áscorbico, ácido cítrico, PVP e carvão ativado no meio ou na forma de banho; b) incubação inicial dos explantes no escuro ou sob baixa intensidade luminosa; c) transferência freqüente dos explantes; d) eliminando-se as porções de tecido oxidado (Grattapaglia & Machado 1990).

Após o isolamento do explante é realizado a inoculação. Quando o meio de cultura é sólido, o explante, com excessão do meristema, é introduzido um pouco no meio, para induzir um estímulo, ou seja, iniciar a se adaptar e a se desenvolver. Se o meio é líquido o mesmo é inoculado sobre uma ponte de papel, que irá absorver o meio e levá-lo ao explante. Em seguida, os tubos que contém os explantes são flambados, fechados e identificados. O material é levado à sala de crescimento onde recebe condições ambientais adequadas para iniciar a incubação.

### 3.4.5. Meios de Cultura

Os meios de cultura usados na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas, fornecem as substâncias essenciais para o crescimento e controlam, em sua maioria, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Complementando as substâncias biossintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são adicionados ao meio para suprir as necessidades metabólicas e estruturais das células (George & Sherrington 1984).

O meio de cultura contém água, sais minerais (macro e micronutrientes), carboidratos, vitaminas, reguladores de crescimento, ágar ou semelhante e, eventualmente outros compostos orgânicos, como aminoácidos e substâncias quimicamente indefinidas, como água de coco e estrato de malte (Caldas *et al.* 1990).

A formulação dos meios varia segundo o gênero, a espécie e a cultivar utilizada,

com a fonte de explante e, com o objetivo a ser alcançado, além do estágio em questão: inicial, multiplicação ou enraizamento.

No estágio inicial o explante se adapta a nova condição de vida e é estimulado a crescer com a adição de fitorreguladores (auxinas, citocininas e giberelinas) no meio de cultura. Durante o estágio de multiplicação o explante continua o crescimento e o material passa a se multiplicar devido a quebra da dominância apical e a indução de proliferação das gemas axilares pela ação da citocinina adicionada ao meio. Nesta fase é freqüente a variação na composição dos macronutrientes, especialmente do nitrogênio, para combater a vitrificação.

No enraizamento das microestacas, as concentrações de sais do meio básico geralmente são reduzidas e adicionado uma auxina no meio de cultura para induzir o enraizamento.

Existem vários tipos de meios de cultura definidos por alguns autores, entre eles destaca-se o meio de Murashige & Skoog (MS), Gamborg que são utilizados por vários laboratórios. O meio de Murashige & Skoog (1962) (tabela 1), é amplamente empregado e refere-se à composição dos sais minerais, podendo ser identificado como um meio básico (padrão para estudos). Dependendo da espécie em estudo, a concentração de carboidratos e de reguladores de crescimento podem variar e são especificados em cada trabalho, a variação dessa concentração tem o objetivo de aumentar as chances de sucesso da micropropagação (Caldas *et al.* 1990).

**Tabela 1. Soluções estoque dos sais de Murashige e Skoog (1962) para a produção dos meios de cultura que fornecem condições básicas para os trabalhos de micropropagação.**

Soluções estoques	Componentes	Concentrações (g/l)
<b>Macronutrientes</b>		
A	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	165
B	$\text{KNO}_3$	190
C	$\text{CaCl}_2+2\text{H}_2\text{O}$	44
D	$\text{MgSO}_4+7\text{H}_2\text{O}$	37
E	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	17
<b>Micronutrientes</b>		
F	$\text{MnSO}_4+\text{H}_2\text{O}$	1,690
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,620
	$\text{ZnSO}_4+7\text{H}_2\text{O}$	0,860
	KI	0,083
	$\text{NaMoO}_4+2\text{H}_2\text{O}$	0,025
	$\text{CuCl}_2+6\text{H}_2\text{O}$	0,0025
G	Fe+EDTA	
	$\text{Na}_2\text{EDTA}+2\text{H}_2\text{O}$	3,73
	$\text{FeSO}_4+7\text{H}_2\text{O}$	2,78

Fonte: Caldas *et al.*, 1990.

OBS: Para a formulação de um litro de meio MS necessita-se de 20 ml das soluções estoques A e B, 10 ml da solução F, 5 ml das soluções C, D, E e G.

#### **3.4.5.1. Componentes dos Meios de Cultura**

a) **Macronutrientes:** são os elementos minerais necessários em maiores quantidades para as plantas. E podem ser adicionados nos meios de cultivo na forma de sais inorgânicos, ou em sua forma orgânica, no caso, o nitrogênio e o enxofre (na forma de aminoácidos, por exemplo). O fósforo, o potássio, o cálcio, o magnésio e o ferro também são elementos fundamentais na composição do meio de cultura (Caldas *et al.* 1990).

b) Micronutrientes: incluem todos aqueles minerais considerados essenciais para as plantas clorofiladas (manganês, zinco, boro, cobre, cloro e molibdênio), além do cobalto e do iodo. A fórmula (MS) é particularmente rica em micronutrientes quando comparada com as outras formulações (Caldas *et al.* 1990).

c) Carboidratos: poucas espécies cultivadas *in vitro* são autótrofas, e portanto, são adicionados ao meio uma fonte de carbono para manter o crescimento da cultura. Os explantes cultivados *in vitro* não tem condições adequadas de iluminação e concentração de CO<sub>2</sub> no interior do frasco e às vezes, não possuem teores de clorofila suficiente para realizar fotossíntese que sustente o seu crescimento. Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de polissacarídeos estruturais como celulose, aminoácidos e proteínas, enfim, todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento e a divisão das células. O requerimento de carboidrato tem sido facilmente satisfeito incorporando-se ao meio sacarose na concentração de 2 a 4 %. A sacarose é a fonte de carbono e energia mais utilizada nos meios nutritivos, nenhuma outra fonte testada (glicose e frutose) tem mostrado superioridade. Pode-se substituir a sacarose pura por açúcar cristal comum em laboratórios de produção em larga escala, sem alterar o desenvolvimento da cultura (Boccon-Gibod 1989a).

d) Vitaminas: a mistura básica utilizada consiste de tiamina (vitamina B1), ácido nicotínico (niacina) e piridoxina (vitamina B6). A tiamina na forma de tiamina-pirosfosfato é um co-fator essencial para reações críticas da respiração aeróbica, a fotossíntese e a biossíntese de alguns aminoácidos e terpenóides em plantas. A piridoxina está envolvida na biossíntese de aminoácidos durante a fotorespiração e em outras vias, incluindo a transaminação de aminoácidos aromáticos que formam a auxina endógena AIA e na biossíntese de alcalóides. O ácido nicotínico também contribui como substrato à biossíntese de alcalóides (Boccon-Gibod 1989a).

e) Mio-inositol: não é essencial, contudo, tem mostrado efeitos benéficos, uma vez que, com a sua adição ao meio de cultura os minerais e hormônios são mais facilmente absorvidos e metabolizados. Quimicamente é um composto cíclico de seis carbonos com grupos -OH em todos eles. Tem efeito estimulador no crescimento. O inositol é incorporado às moléculas de fosfolipídios que compõem a estrutura da membrana plasmática. Tem ação na conjugação de auxinas: uma reação enzimática forma o composto

auxina-inositol, que é inativo como regulador de crescimento. Quando a auxina é novamente liberada por outra reação enzimática, volta a exercer os seus efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento das células. Ele é sintetizado por todas as células das plantas pela ciclização da glicose.

f) Reguladores de crescimento: “são substâncias sintéticas não produzidas por plantas, mas que, quando aplicadas as plantas, produzem efeitos semelhantes aos produzidos por hormônios.” (Ferri 1985).

A composição e concentração dos reguladores de crescimento no meio são fatores determinantes no crescimento e no padrão de expressão morfogênética na maioria dos sistemas de cultura de tecidos. As auxinas e as citocininas são os reguladores de crescimento mais usados. Da interação desses dois grupos de substâncias é que controla-se a expressão da morfogênese vegetal. A concentração relativa entre os reguladores de crescimento regula a iniciação de raiz, parte aérea ou calo, para cada uma destas fases ocorre a atuação de uma ou várias substâncias em interação ou não e que proporcionam respostas diferenciadas sobre as diferentes fases.

As auxinas são substâncias que promovem o alongamento celular e portanto, o crescimento. Existem várias auxinas chamadas naturais sendo a mais usada o ácido 3-indolacético (AIA), sendo considerada instável, pois se degrada facilmente pela luz, calor ou pela atividade microbiana. Existem várias substâncias químicas sintéticas com efeito semelhante ao do AIA, chamadas de auxinas sintéticas, entre as quais o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) que freqüentemente induz a formação de calo, e pode ser importante para a indução da embriogênese somática; o ácido indolbutírico (AIB) que é freqüentemente usado para a indução de raízes *in vitro*; o ácido naftalenoacético (ANA) que é mais forte e não se inativa tão rapidamente, induzindo a formação de raízes mais precocemente (Flick *et al.* 1983).

As citocininas atuam sobre a divisão celular e diferenciação celular, a diferenciação de parte aérea e quebra de dominância apical. As citocininas mais usadas são: a benzilaminopurina (BAP) que induz a formação de brotos e alta taxa de multiplicação em sistemas de micropropagação; a isopenteniladenina (2iP) e 6-furfurilaminopurina (cinetina-KIN) que permitem apenas o crescimento normal sem brotações múltiplas; e a zeatina (citocinina natural) que é bastante ativa. Atualmente o BAP é a citocina mais utilizada por

ser composto muito ativo e se encontrar facilmente disponível (Krikorian 1991).

g) Agente gelificante: o ágar é o mais utilizado. É um polissacarídeo extraído de algas marinhas que gelifica o meio de cultura para servir de suporte ao explante. Ele é dissolvido em água fervente e gelifica na presença de cátions quando esfriado. Se for autoclavado em pH abaixo de 4,5 ocorre hidrólise do ágar e não polimeriza mais ao esfriar. A consistência do meio depende da concentração utilizada (Caldas *et al.* 1990).

h) Antioxidantes: alguns meios necessitam de antioxidantes (ácido cítrico, ascórbico, cisteína) para evitar a deterioração de tecidos recém extraídos, ou substâncias capazes de absorver os metabólicos tóxicos (carvão ativado), que venham a ser formados pelo explante durante a oxidação dos compostos fenólicos ou presentes no ágar. O carvão ativado possui a função de escurecer o meio, impedindo a incidência de luz na base do explante, reduzindo a oxidação (Torres & Caldas 1990).

#### **3.4.5.2. Preparação do Meio de Cultura**

Os procedimentos de preparação dos meios de cultura são muito variáveis entre os laboratórios, mas geralmente seguem a descrição a seguir: normalmente são mantidas soluções estoques dos sais em geladeira, bem como de vitaminas e dos reguladores de crescimento. A sacarose e o ágar são pesados no momento em que forem empregados. As medidas são realizadas com material de precisão como balão volumétrico, provetas e pipetas (Caldas *et al.* 1990).

O procedimento consiste em pipetar as soluções estoque dos macro e micronutrientes, seguido pelas vitaminas e reguladores de crescimento num balão volumétrico com o volume de meio que se deseja preparar. A sacarose é pesada e dissolvida em água destilada e adicionada ao meio. A seguir completa-se o volume do balão volumétrico em água destilada. O volume do balcão é transferido para um becker onde é medido o pH. Quando o meio estiver ácido deve ser adicionado uma base, geralmente é utilizado NaOH, e quando estiver básico adiciona-se um ácido, geralmente o HCl, até que seja atingido o pH recomendado para a cultura em questão. Caso o meio seja sólido, acrescenta-se o ágar e leva-se ao forno para ser aquecido até a fervura. O próximo passo consiste em distribuir o volume adequado de meio nos tubos de ensaio ou vidros de cultura, fechando-os com tampa plástica ou papel alumínio e vedados com filme plástico.

Finalmente, os meios são esterilizados em autoclave à 121 °C por 15 a 20 minutos, com uma pressão de 1 a 1,5 atm.

#### **3.4.5. Condições ambientais de incubação**

Após a inoculação dos explantes em meio de cultura, é conveniente que os cultivos sejam incubados em ambiente com luz e temperatura controlada. Em relação a temperatura, a maior parte das culturas cresce satisfatoriamente em temperaturas que variam de 20 a 27°C, durante o estabelecimento, a multiplicação e o enraizamento. As temperaturas acima ou abaixo podem ser favoráveis ao desenvolvimento de algumas espécies (Boccon-Gibod 1989b).

Apesar das culturas *in vitro* apresentarem uma baixa taxa fotossintética e o carbono necessário deve ser fornecido através de carboidratos, tendo como principal fonte a sacarose, a luz é necessária para regular o processo de morfogênese como a formação de brotos e a iniciação de raízes. O escuro ou a baixa intensidade luminosa durante os primeiros dias após a inoculação podem reduzir a oxidação fenólica dos explantes. Na fase de enraizamento freqüentemente as partes aéreas foram submetidas a reduzidas intensidades luminosas ou ao escuro total durante alguns dias na fase de indução do sistema radicular, pois a luz nestas etapas pode diminuir os teores endógenos de AIA, também causa um acúmulo de fenóis e de seus subprodutos que inibem o processo de enraizamento.

A iluminação da cultura deve considerar os aspectos de intensidade, período de luminosidade e qualidade. A intensidade luminosa comumente utilizada é de  $5\mu\text{M.m}^{-2}\text{s}^{-2}$ . O fotoperíodo tende a ser de dias longos para evitar a dormência em espécies sensíveis, geralmente é de 16 horas de luz e 8 de escuro. A luz é fornecida por lâmpadas fluorescentes (Boccon-Gibod 1989b).



### 3.4.6. Repicagem

A repicagem é realizada em condições assépticas em câmara de fluxo laminar. A primeira repicagem transfere o explante do meio inicial para o meio de multiplicação, o número de repicagens subsequentes é definido de acordo com o número de partes aéreas que se deseja obter e a taxa de multiplicação da espécie. Cada espécie vegetal apresenta um número máximo de repicagens (principalmente na organogênese direta), devido a diminuição do vigor e o aumento do risco de variação somaclonal. Esta operação estimula o crescimento, uma vez que a parte oxidada é limpa rejuvenescendo o tecido vegetal. A oxidação também altera o pH do meio de cultura prejudicando a difusão de nutrientes.

A frequência das subculturas, o tipo e o tamanho do explante subcultivado e os seus cuidados no procedimento de repicagem são fatores que influenciam a homogeneidade das plantas produzidas.

O intervalo entre subculturas varia de acordo com a espécie, tipo de explante, idade e estágio que a planta matriz se encontrava quando os explantes são retirados, entre outros fatores. O ideal é fazer as repicagens quando as plantas estiverem em fase de crescimento ativo das partes aéreas, aliando o máximo vigor de crescimento com a máxima taxa de multiplicação (número de novos explantes produzidos por explante num certo período de tempo).

Os sistemas de multiplicação que podem ser empregados são:

1. Caule único, onde são separados segmentos nodais para iniciar a nova cultura;
2. Proliferação de gemas axilares e/ou adventícias, formando um tufo de eixos caulinares. O tufo pode ser subdividido em explantes contendo mais de um eixo caulinar, podem ser isolados vários segmentos caulinares contendo gemas laterais. Ao optar por um desses sistemas deve-se considerar a rapidez da operação, a taxa de multiplicação e a variabilidade na resposta de multiplicação dos novos explantes na geração seguinte.

Em relação ao tamanho do explante, os muito pequenos, contendo uma ou poucas gemas, muitas vezes demoram excessivamente para iniciar a fase de crescimento ativo na subcultura seguinte, o que reduz drasticamente a taxa de multiplicação. A proliferação de gemas pode ser estimulada fazendo cortes longitudinais nos explantes subcultivados, ou retirando o ápice para quebrar a dominância apical e inocular as partes aéreas

horizontalmente sobre o meio.

Durante o processo de repicagem deve ser tomado o cuidado de preparar um pequeno número de explantes por vez, pois a mudança de um ambiente saturado de umidade para a exposição ao fluxo de ar contínuo da câmara causa desidratação nos tecidos. É importante fazer uma seleção do material contando as anormalidades ou deteriorações como vitrificações, folhas secas, calos na base, ápices necrosados e tecido oxidado.

A contaminação que pode ocorrer durante a etapa de multiplicação é um problema grave, embora os agentes contaminantes não sejam patogênicos, podem comprometer o desenvolvimento da cultura pela competição pelo meio de cultura.

O material contaminado deve ser descartado, autoclavando-se os frascos a fim de evitar a disseminação dos microorganismos para as outras culturas limpas. Durante a repicagem devem ser tomadas medidas preventivas como observar cuidadosamente a base das culturas contra a luz, trocar o etanol de flambagem com frequência, usar dois conjuntos de ferramentas (enquanto um é utilizado o outro fica imerso em hipoclorito de sódio concentrado), usar lamparina a gás que fornece chama mais quente que a álcool, flambar demorada e repetidamente os instrumentos a cada certo número de frascos repicados e evitar o trabalho simultâneo com material contaminado e material limpo.

#### **3.4.7. Transplantio e Aclimatização**

“A etapa de transplantio envolve a transferência da planta da condição *in vitro* para a casa de vegetação, onde é submetida a uma fase de aclimatização e endurecimento. Esta passagem é bastante crítica e representa em alguns casos um fator limitante do processo de micropropagação.” (Grattapaglia & Machado 1990).

Grattapaglia & Machado 1990 resumem em quatro fatores preocupantes nesta fase: “1) a planta passa de uma situação de reduzido fluxo transpiratório, devido a baixa intensidade de luz e a elevada umidade relativa, para um ambiente que demanda um incremento na taxa de respiração, ficando muito vulnerável a um estresse hídrico; 2) a planta passa de uma existência heterotrófica, na qual depende de um suprimento externo de

energia (sacarose no meio), para um estado autotrófico, no qual precisa realizar a fotossíntese para sobreviver; 3) a planta retirada de uma condição de alta disponibilidade de nutrientes no meio para outra onde precisa rapidamente incrementar a absorção de sais; 4) a planta sai de um estado asséptico e fica sujeita ao ataque de microorganismos saprofíticos e patogênicos.”

Durante a fase de aclimatização, o estresse causado pela rápida mudança de umidade relativa, poderia ser reduzido, se a umidade relativa dos frascos fosse alterada gradativamente, abrindo-se as tampas ainda na sala de incubação, antes do transplantio. Com isso, os estômatos estariam mais adaptados a nova condição de umidade e haveria um estímulo a produção de cera nas folhas, reduzindo a perda de água no transplantio.

O tamanho e a condição do sistema radicular no momento do transplante determina o seu sucesso. O ideal é que as raízes sejam curtas, facilitando a lavagem e retirada do meio de cultura aderido. As raízes curtas também ajudam evitar cortes que podem ser entradas para patógenos, facilitam a introdução da planta no substrato, além de garantir que estejam numa fase de crescimento ativo para acelerar o pegamento da plântula.

É importante também adaptar a planta a condição autotrófica ainda *in vitro*. Isto pode ser feito reduzindo ou eliminando a fonte de carbono do meio, aumentando a intensidade luminosa e a concentração de CO<sub>2</sub>. Com isso a planta terá condições de realizar a fotossíntese.

A rápida perda de água da planta no transplantio é decorrente de deficiências das folhas que dificultam o controle da transpiração: os estômatos não funcionais, a camada de cera protetora sobre as folhas é muito pequena, a conexão entre o sistema vascular do caule e das raízes adventícias ainda é precária para permitir um fluxo transpiratório adequado. Portanto a manutenção de uma umidade relativa alta desde a retirada das plantas do meio de cultura até se verificar a retomada do crescimento da planta é um fator chave para sua sobrevivência até a correção das deficiências. Com esta adaptação inicial, a planta passa a realizar a fotossíntese em níveis suficientes para estimular o desenvolvimento de raízes funcionais. Os sistemas utilizados para manter uma umidade alta são vários e dependem da escala de trabalho.

Quando se tem um pequeno número de plantas pode-se cobrir os vasos individualmente com sacos plásticos. Com um grande número de plantas é conveniente

usar bandejas alveoladas de isopor ou tubetes, pois permite a manipulação de plantas em grupos. Estes são acomodados em telados, túneis plásticos e casa de vegetação com controle automático de temperatura. Para auxiliar a manutenção de temperaturas mais amenas e para reduzir a incidência direta da luz sobre as plantas, é comum o sombreamento parcial destas construções com 'sombrite'. A umidade é mantida elevada utilizando-se coberturas plásticas sobre as plantas ou com sistemas de nebulização manuais ou automatizados.

O substrato de transplante, do ponto de vista físico, deve ter uma boa capacidade de retenção de umidade e não compactar-se excessivamente, comprometendo a drenagem e consequentemente a aeração do sistema radicular. Quimicamente, ele deve ser inerte de modo a permitir a manipulação dos conteúdos de nutrientes de acordo com a necessidade da espécie. Este deve ser de alguma forma esterilizado, seja através de autoclavagem, fumigação ou pasteurização em caldeira.

Em relação à condição fitossanitária do ambiente de transplantio é importante salientar, que o ambiente formado (alta umidade relativa e temperatura) é favorável ao desenvolvimento de microorganismos saprofitos e patogênicos que têm seu ataque facilitado pela condição de fragilidade dos tecidos das plantas poucos lignificados e desprovidos de camada cuticular. Portanto, cuidados preventivos como a esterilização dos vasos, bandejas e outros materiais com hipoclorito de sódio e o controle de acesso de insetos são medidas para evitar principalmente fungos causadores de tombamento de mudas e a infestação por ácaros ou pulgões (Grattapaglia & Machado 1990).

#### **4. Atividades desenvolvidas durante o estágio sobre a Micropropagação de *Tibouchina urvilleana* (DC.) Cogn.**

Durante o período de estágio no Laboratório de Morfogênese Vegetal do Centro Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina - CCA / UFSC foram realizadas atividades de esterilização de materiais utilizados na montagem dos experimentos, repicagem de culturas, práticas de isolamento de meristemas, preparação de meios de cultura e testes de germinação.

Nesse laboratório são micropropagadas várias espécies vegetais como: macieira, videira, pereira, canela sassafrás e *Tibouchina urvilleana*. No presente relatório serão descritos os experimentos realizados para o estabelecimento de um protocolo de micropropagação desta última espécie.

##### **4.1. Título**

---

Micropropagação de *Tibouchina urvilleana* (DC.) Cogn. (Melastomataceae) para a Revegetação de Áreas Degradadas na Ilha de Santa Catarina.

## 4.2. Introdução

---

As Melastomataceae contribuem para a flora ornamental com um grande número de espécies de vários gêneros. Neste contexto, o gênero *Tibouchina* destaca-se, principalmente, com representantes arbóreos como por exemplo a quaresmeira - *T. granulosa* (Desr.) Cogn. - , o manacá-da-serra - *T. pulchra* (Cham.) Cogn. - e com representantes arbustivos como a *T. urvilleana* (DC.) Cogn.

A *Tibouchina urvilleana* distribui-se em Santa Catarina dos ecossistemas de restingas até as dunas e, em conjunto com outras espécies vegetais, participa da fixação e embelezamento destas dunas e restingas.

Apesar da pouca relevância em termos de pesquisa e do uso como ornamental que este gênero recebe no Brasil, *T. urvilleana* desde o início do século XX vem sendo utilizada na Europa tanto na ornamentação de terraços ou jardins de inverno e em vasos, bem como planta fixadora de dunas móveis (Heitz 1986; Köchel & Köckel 1987). A comercialização de mudas desta espécie nos países europeus e da América do Norte já está bem desenvolvida, fazendo com que uma muda alcance o preço de US\$ 5.00 (Internet 1998).

Atualmente vem sendo estudado metodologias para a propagação desta espécie, principalmente pela propagação por estacas herbáceas, com resultados promissores (Zimmermann com. Pess.). Entretanto tais metodologias favorecem a disseminação de doenças causadas por fungos e vírus e a proliferação de insetos (Vaz 1986).

A cultura *in vitro* de meristemas é considerada um instrumento valioso na obtenção de plantas livres de vírus e de outros patógenos, na propagação clonal rápida, no desenvolvimento de variedades melhoradas, na preservação de germoplasma e para um melhor entendimento dos princípios básicos relacionados com a fisiologia, a bioquímica e o desenvolvimento das plantas (Vaz 1986).

### **4.3. Objetivo**

---

Sendo um dos primeiros cultivo *in vitro* de *T. urvilleana*, este tem o objetivo de estabelecer pontos básicos para a micropropagação desta espécie como: o tipo de explante a ser utilizado, os métodos de assepsia dos explantes coletados, o meio de cultura para o seu cultivo primário, o comportamento desta quanto à capacidade de regeneração de plântulas a partir de cultura de meristemas laterais.

### **4.4. Materiais e Métodos**

---

#### **4.4.2. Coleta do Explante**

Os explantes de *T. urvilleana* foram coletados de plantas matrizes cultivadas na casa-de-vegetação situada no CCA-UFSC. Estas plantas matrizes foram estabelecidas a partir de coletas de estacas de plantas situadas nas dunas móveis das praias da Joaquina, do Campeche e do Santinho, no município de Florianópolis. As plantas matrizes estão sendo mantidas isentas de problemas fitossanitários e em ótimo estado nutricional com as pulverizações e as adubações periódicas, respectivamente (Figura 2, em anexo).

Os explantes foram coletados das plantas matrizes em pleno desenvolvimento vegetativo. Os ápices caulinares, com a gema apical e mais três a quatro gemas axilares das matrizes, foram extraídos e juntamente com o excesso de folhas. Após, o material foi colocado num Bécker com água esterilizada para evitar a desidratação e diminuir a oxidação dos tecidos lesados, sendo também identificado e levado imediatamente ao laboratório para o isolamento de meristemas da *T. urvilleana*.

#### **4.4.4. Isolamento dos Meristemas**

O isolamento dos meristemas foi realizado em câmara de fluxo laminar utilizando-se um microscópio estereoscópio. Os instrumentos utilizados foram esterilizados (pinças de diferentes tamanhos, bisturis e placas de Petri), sendo necessários dois conjuntos de instrumentos para agilizar o trabalho. Após o isolamento de cada meristema os instrumentos foram mergulhados em etanol absoluto e flambados, sendo utilizados somente quando estavam frios. Fez-se o uso de uma máscara e de um guarda-pó para diminuir a contaminação dos explantes.

Para localizar o meristema, as folhas foram cuidadosamente retiradas com o auxílio da ponta da pinça e do bisturi. O meristema foi identificado pela sua forma característica: um grupo de células de formato esférico com tamanho de 0,3 a 0,5 mm. O meristema foi isolado com um primórdio foliar para facilitar o seu estabelecimento *in vitro*, tendo um comprimento de 1 cm. Após o isolamento, os meristemas foram inoculados em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 ml de meio de cultura inicial. Os tubos foram fechados com as suas tampas e envoltos com filme plástico e em seguida, levados a sala de crescimento, onde foram incubados.

#### **4.4.3. Desinfestação do Explante**

Para estabelecer um protocolo de desinfestação eficiente dos explantes provenientes das plantas matrizes foi necessário testar diferentes metodologias de assepsia.

##### ***Experimentos de assepsia***

Após a coleta, os meristemas laterais foram alocados em água destilada (200 ml) por 10 minutos, sendo em seguida aplicados os diferentes tratamentos em seis experimentos, explicitados abaixo:

No primeiro experimento os meristemas foram lavados com 3 ml de detergente, por 15 minutos em agitação. Em seguida, foram lavados em álcool 70 %, por 3 minutos em



agitação e em hipoclorito de sódio (QBOA à 40 %) por 10 minutos sob agitação. Os meristemas foram lavados novamente, em álcool 70 %, por 2 minutos em agitação e a seguir levados para a câmara de fluxo laminar, onde foram lavados em água autoclavada por 3 vezes. Após a complementação da lavagem os meristemas foram mantidos na água da última lavagem, até suas inoculações no meio de cultura.

No segundo experimento, os meristemas foram lavados em água destilada (200 ml) com 3 ml de detergente, por 20 minutos sob agitação, em álcool 70 %, por 5 minutos em agitação, em hipoclorito de sódio (QBOA à 40 %) por 20 minutos sob agitação, novamente em álcool 70 %, por 5 minutos em agitação e a última etapa idem ao experimento 1.

No terceiro, os meristemas foram lavados em água destilada (200 ml) com 3 ml de detergente e com 1 g/l de Benlate, por 20 minutos em agitação, em álcool 70 %, por 5 minutos em agitação, em hipoclorito de sódio (QBOA à 40 %) por 20 minutos em agitação, novamente, em álcool 70 %, por 5 minutos em agitação e a última etapa idem ao experimento 1.

No quarto, os meristemas foram lavados em água destilada (200 ml) com 3 ml de detergente e com 2 g/l de Benlate, por 20 minutos em agitação, em álcool 70 %, por 5 minutos em agitação, em hipoclorito de sódio (QBOA à 40 %) por 20 minutos em agitação, novamente, em álcool 70 %, por 5 minutos em agitação. A seguir passam para a câmara de fluxo laminar, onde os meristemas foram lavados em água autoclavada por 3 vezes, mantendo-se os mesmos na água da última lavagem e esta com 2 g/l de Benlate autoclavado, até as suas inoculações no meio de cultura.

No quinto experimento, os meristemas foram submetidos as mesmas lavagens do segundo experimento, contudo quando foram transferidos para a câmara de fluxo laminar, estes meristemas foram lavados em água autoclavada por 3 vezes, mantendo-se os meristemas por 10 minutos na água da última lavagem e esta com 1 g/l de Benlate autoclavado, logo após havendo a inoculação no meio de cultura.

No sexto, os meristemas foram submetidos as mesmas lavagens do segundo experimento, entretanto passaram para a câmara de fluxo laminar, onde os meristemas foram lavados por 3 vezes em água + 1 g/l de Benlate autoclavado, mantendo-se os meristemas por 30 minutos na água da última lavagem e esta com 1 g/l de Benlate, logo

após havendo a inoculação no meio de cultura.

Para isso foram realizados seis experimentos com delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições e vinte frascos por parcela. Os experimentos abaixo descritos foram analisados por meio da análise de variância e comparação de médias pelo teste de DMS (Zonta & Machado 1989) a nível de 1% de probabilidade. Para realizar a análise estatística, os dados de percentagem foram transformados em  $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$ .

#### **4.4.1. Meios de Cultura**

Para o estabelecimento do cultivo inicial e da multiplicação dos meristemas de *T. urvilleana in vitro*, foi utilizado um meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com diferentes concentrações de BAP, mais 0,5 AIB, 0,1 GA<sub>3</sub>, 100mg/l de mio-inositol, 30g/l de sacarose, 6g/l de ágar e 0,1% de carvão ativo. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

Após, o meio foi distribuído num volume de 10 ml em tubos de ensaio com dimensões de 25 x 150 mm, em seguida, os tubos foram fechados com tampa plástica e esterilizados em autoclave a 121°C, 1,3 kg cm<sup>-2</sup>, durante 20 minutos.

#### **4.4.5. Condições Ambientais de Incubação**

Os meristemas foram incubados numa sala de crescimento com luz (fotoperíodo e intensidade luminosa) e temperatura controlada. A temperatura foi mantida constante em 27 °C ± 1°C. O fotoperíodo foi de 16 horas de luz e a intensidade luminosa de 50µM.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Para isso, foram utilizadas lâmpadas fluorescentes.

Os meristemas foram mantidos durante 5 a 13 dias no escuro, com o intuito de diminuir a oxidação destes. Ainda foi realizado um experimento com a finalidade de avaliar o efeito da redução da concentração dos nutrientes (sais) do meio de cultura MS na redução da oxidação dos explantes inoculados.

### ***Experimentos de oxidação***

Neste experimento a assepsia foi realizada pela lavagem dos meristemas em água destilada (200 ml) com 3 ml de detergente, por 20 minutos em agitação, em álcool 70 %, por 5 minutos em agitação, em hipoclorito de sódio (QBOA à 40 %) por 20 minutos em agitação, em álcool 70 %, por 5 minutos em agitação. A seguir passam para a câmara de fluxo laminar, onde os meristemas foram lavados por 3 vezes em água + 1 g/l de Benlate autoclavado, mantendo-se os meristemas por 30 minutos na água da última lavagem e esta com 1 g/l de Benlate, logo após havendo a inoculação no meio de cultura.

Os meristemas foram colocados individualmente nos frascos, classificando-se os explantes em três níveis de oxidação: 1) baixo: com as gemas em crescimento e coloração verde; 2) médio: com as gemas sem crescimento e com escurecimento em suas bordas; 3) alto: com a coloração da gema totalmente escurecida e sem crescimento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e dez explantes por parcela. Os tratamentos foram com quatro concentrações diferentes de sais do meio MS, sendo: o primeiro tratamento com  $\frac{1}{4}$  dos sais totais do MS ( $\frac{1}{4}$  MS), o segundo tratamento com  $\frac{1}{2}$  dos sais totais do MS ( $\frac{1}{2}$  MS), o terceiro tratamento com a concentração normal de sais do MS (1/1 MS) e o quarto tratamento com o dobro da concentração normal dos sais do MS (2 MS).

Os tratamentos foram analisados por meio da análise de variância e comparação de médias pelo teste de DMS (Zonta & Machado 1989) a nível de 1% de probabilidade. Para realizar a análise estatística, os dados de percentagem foram transformados em  $\arcsin \sqrt{x/100}$ .

#### **4.4.6. Repicagem**

Quando o explante deu origem a um caule com uma altura média de 5 cm de comprimento, este foi seccionado em vários explantes formados por duas gemas no máximo e com tamanho de aproximadamente de 1 cm. Para isso foram retiradas as folhas maiores e as raízes. A seguir os segmentos foram inoculados, na posição vertical, em meio geleificado. As gemas se desenvolveram formando novos caules que serão novamente repicados. Repetiu-se este processo até atingir o número desejado de mudas.

Buscando obter-se um maior número de brotações e estas com um maior comprimento de caule, foram adicionados ao meio de cultura MS diferentes concentrações de Benzilaminopurina (BAP) onde foi avaliado o efeito das concentrações de BAP na percentagem média de regeneração de plântulas por explante inoculado no experimento de multiplicação.

Com o intuito de detectar a dominância apical das gemas das plântulas *in vitro* foi instalado um experimento com tipos de explantes diferentes curvas de crescimento vegetativo.

#### ***Experimento de multiplicação***

Foi instalado um experimento com delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições e com dez explantes por parcela. Em cada frasco foi colocado um explante. Os tratamentos foram as seguintes concentrações de BAP no meio de cultura MS: o primeiro tratamento não foi adicionado BAP (0), no segundo tratamento foi adicionado 1  $\mu\text{M}$  /l de BAP (1), no terceiro tratamento foi adicionado 2  $\mu\text{M}$  /l de BAP (2) e no quarto tratamento foi adicionado 4  $\mu\text{M}$  /l de BAP (4).

Os tratamentos foram analisados por meio da análise de variância e comparação de médias pelo teste de DMS (Zonta & Machado 1989) a nível de 1% de probabilidade. Para realizar a análise estatística, os dados de percentagem foram transformados em  $\arcsin \sqrt{x/100}$ .

#### ***Experimento de determinação da dominância apical***

Foi instalado um experimento com delineamento inteiramente casualizado, com

quatro repetições e com doze explantes por parcela. Em cada frasco foi colocado um explante. Os tratamentos foram constituídos por diferentes tipos de explante e denominados de: 1) **apical**: constituído de um segmento de 1 cm em que estavam o meristema apical e as duas primeiras gemas laterais; 2) **médio**: estes foram constituídos pelos segmentos de 1 cm e cada segmento possuía um par de gemas laterais, estes segmentos ficavam entre o explante apical e o explante basal; 3) **basal**: constituído por um segmento de 1 cm, onde estava o último par de meristema laterais, sem as raízes.

O meio de cultura utilizado foi o MS + carvão ativado e foram feitas as avaliações após 20 dias de cultivo. Os tratamentos foram analisados por meio da análise de variância e comparação de médias pelo teste de DMS (Zonta & Machado 1989) a nível de 1% de probabilidade. Para realizar a análise estatística, os dados de percentagem foram transformados em  $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$ .

#### **4.4.7. Viabilidade das Sementes de *Tibouchina urvilleana* e o seu comportamento *in vitro*.**

Para determinar a viabilidade das sementes de *T. urvilleana* e na avaliação do comportamento destas sementes *in vitro* foram realizados os experimentos descritos a seguir:

##### ***Experimento de viabilidade das Sementes de Tibouchina urvilleana***

Os frutos maduros de *T. urvilleana* foram coletados de uma planta matriz cultivada num abrigo situado no CCA-UFSC e acondicionados em sacos de papel. As cápsulas foram secas em estufa a 50°C por 1 dia, em seguida estas sementes foram separadas manualmente com o auxílio de um microscópio estereoscópio, sendo armazenadas num tubo de ensaio, em geladeira à 6°C. Para a germinação, 100 sementes foram dispostas em uma placa de Petri de 6 cm de diâmetro, forradas com papel filtro umedecido com água destilada, numa sala de incubação com fotoperíodo de 16 horas e a uma temperatura de 27 ( $\pm 1$ ) °C.

Para a avaliação foram observados os seguintes parâmetros: a) percentual total de germinação e b) tempo médio de germinação. Sendo que a partir da semeadura, foram feitas contagens diárias das plântulas emergentes na placa.

Considerou-se germinada a semente cuja as folhas cotiledonares estivessem

aparecendo por baixo do tegumento, de acordo com o critério agrônomo de germinação (Figura 3). Os dados não foram analisados estatisticamente apenas, apresentados em percentagem.

***Experimento de Viabilidade de sementes de T. urvilleana in vitro.***

Na montagem desse experimento foram utilizadas sementes de *T. urvilleana* desinfestadas, estas sementes foram lavadas dentro da câmara de fluxo laminar em hipoclorito de sódio (QBOA à 40%) por 20 minutos em agitação e foram lavados em água + 1 g/l de Benlate autoclavado por 3 vezes, mantendo-se as sementes por 30 minutos na água da última lavagem e esta com 1 g/l de Benlate, logo após havendo a inoculação no meio de cultura.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e dez frascos por parcela. Em cada frasco foi colocado um explante. Os tratamentos foram as seguintes concentrações de BAP no meio de cultura MS: o primeiro tratamento foi testemunha (sem BAP), no segundo tratamento foi adicionado 1 mg/l de BAP (1), no terceiro tratamento foi adicionado 2 µM/l de BAP (2) e no quarto tratamento foi adicionado 4 µM/l de BAP (4).

Os dados não foram analisados estatisticamente, apenas apresentados em percentagem.

## 4.5. Resultados e Discussão

---

### 4.5.1. Assepsia

A percentagem de explantes contaminados com fungos no experimento de assepsia 5 (com água + 1g/l de Benlate autoclavado, por 10 minutos) foi de 35,92%. Já os experimentos 4 (com água + 2 g/l de Benlate autoclavado) e 6 (com água + 1g/l de Benlate autoclavado, por 30 minutos) apresentaram resultados mais significativos na redução dos explantes selecionados contaminados com fungos, sendo: 10,48 e 8,5 % contaminados, respectivamente (Tabela 2.).

Os experimentos com resultados significativos na redução de explantes contaminados tiveram como característica comum o uso de um fungicida autoclavado (Benlate) cujo o princípio ativo (p.a) é o Benomyl, o qual, segundo Hauptmann *et al.* (1982) *apud* Edwin (1993), quando submetido a altas temperaturas se desmembra em duas novas moléculas, sendo uma delas o cabendazim que tem ação de fungistática sistêmica e a outra em Dimetilsufóxido que não tem ação fungistática, além de ser tóxico para as células vegetais quando estão em suspensões celulares. A ação tóxica do Dimeltisufóxido foi observado quando os explantes foram lavados em soluções de água + 2g/l de Benlate autoclavado causando a sua oxidação.

O aumento do tempo de exposição dos meristemas laterais (explantes) aos produtos utilizados na sua desinfestação não promoveram uma redução significativa da percentagem de contaminação fúngica. A eficiência do fungicida no controle de fungos não foi influenciado pelo aumento do tempo de imersão dos explantes na solução água + fungicida. Isso foi comprovado pela ausência de diferença significativa entre os experimentos 4 (10 minutos) e 6 (30 minutos).

Contudo, a adição de substâncias fungistáticas tanto meio de cultura como desinfestantes dos explantes reduzem a contaminação durante o estabelecimento do cultivo e se mostram como uma alternativa viável.

**Tabela 2. Percentagem de meristemas laterais (explantes) de *Tibouchina urvilleana* (DC) Cogn. contaminados por fungos após a desinfestação.**

Tratamentos	Explantes contaminados (%)	DMS (5%)
Experimento 2	100,00	a
Experimento 3	98,87	a
Experimento 1	98,00	a
Experimento 5	35,92	b
Experimento 4	10,48	c
Experimento 6	8,50	c
C. V (%)		11,41

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de DMS a 5 % de probabilidade.

#### 4.5.2. Oxidação

O meio de cultura (2 MS) com o dobro da concentração normal de sais do meio MS apresentou 75 % dos explantes à nível alto e de 25 % à nível baixo de oxidação. No meio de cultura MS obteve-se 20 % dos explantes à nível alto, 60 % à nível médio e 20 % à nível baixo de oxidação. O meio de cultura (1/2 MS) com a metade da concentração de sais do MS não apresentou explantes à nível alto de oxidação, 80 % dos explantes à nível médio e 20 % à nível baixo de oxidação. No meio de cultura (1/4 MS) com um quarto da concentração de sais do MS resultou em 100 % dos explantes à nível médio de oxidação (Tabela 3).

Os meios de cultura MS com as suas concentrações de sais reduzidas possibilitaram resultados mais eficientes na redução da oxidação desses meristemas laterais em relação aos demais tratamentos, apresentando as maiores percentagens de explantes no nível médio de oxidação e ausência de explantes no nível alto (Tabela 3). Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por BIASI *et al.* (1994) que encontrou os menores índices de oxidação na cultura *in vitro* do abacateiro utilizando meio de cultura em concentrações de sais reduzidas.



**Tabela 3. Percentagem de meristemas laterais de *Tibouchina urvilleana* em três níveis de oxidação: baixo, médio e alto, de acordo com a concentração de sais do meio de cultura MS.**

Tratamentos	Níveis de oxidação		
	Baixo	Médio	Alto
2 MS	25 A	0 D	75 A
MS	20 A	60 C	20 B
½ MS	20 A	80 B	0 C
¼ MS	0 B	100 A	0 C
CV %	25,1	6,8	17,2

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de DMS a 1 % de probabilidade.

Foi observado que todos os explantes com um nível baixo de oxidação originaram novas plântulas *in vitro*, enquanto que 50 a 70 % dos explantes à nível médio de oxidação produziram novas plântulas. Entretanto, os explantes à nível alto de oxidação não originavam novas plântulas *in vitro*.

Em geral, não ocorre oxidação dos explantes de *T. urvilleana* após os 20 dias da inoculação *in vitro*. Durante esta fase crítica de adaptação do meristema (explante) ao meio de cultura, observou-se que o meristema adquiriu uma pigmentação verde ao 7º dia e ao 10º a 13ª dia da inoculação *in vitro* ocorreu o aumento do seu volume, sendo então diferenciadas as primeiras folhas. Estas observações foram coletadas dos explantes com nível baixo e médio de oxidação, já que os explantes à nível alto de oxidação não se desenvolveram.

#### 4.5.3. Multiplicação

O experimento de multiplicação obteve no tratamento 0 BAP (sem BAP no meio cultura) 1,1 brotações por explante. O tratamento 1 BAP (com 1 mg/l BAP acrescido no meio de cultura) originou 1,2 brotações/explante e o tratamento 2 mg/l BAP resultou em 1,3 brotações/explante. Enquanto que, o tratamento com 4 mg/l BAP não obteve brotações dos explantes. A adição de diferentes concentrações de BAP (0, 1, 2 mg/l) no meio de cultura não promoveu um aumento significativo do número de brotações das gemas axilares

dos meristemas laterais. Estes resultados demonstraram que a adição de concentrações de BAP 4 mg/l ao meio de cultura causou a morte das gemas axilares inoculadas.

O meio de cultura do tratamento (0 BAP) sem a adição de BAP possibilitou a obtenção de 9 % dos explantes em plântulas, o tratamento (1 BAP) com uma concentração de BAP 1 mg/l no meio de cultura regenerou 13,5 % dos explantes. A concentração de BAP 2 mg/l no meio de cultura sendo o tratamento (2 BAP), apresentou 24 % dos explantes regenerados em plântulas, enquanto que com uma concentração de BAP 4 mg/l o tratamento (4 BAP), não regenerou nenhuma plântula, não sendo, portanto, recomendado (Tabela 4).

**Tabela 4. Percentagem média de regeneração de plântulas a partir do cultivo *in vitro* de meristemas laterais de *Tibouchina urvilleana*, após 56 dias de cultivo, de acordo com as concentrações de BAP (0, 1, 2 e 4 mg/l).**

Concentrações de BAP nos meios de Cultura (mg/l)	Percentagem média de plântulas a partir de meristemas laterais	DMS (5%)
2 BAP	24,00	a
1 BAP	13,50	ab
0 BAP	9,00	bc
4 BAP	0,00	c
C. V (%)		20,51

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de DMS a 1 % de probabilidade.

Entretanto, houve um aumento significativo na percentagem média de regeneração de plântulas a partir de meristemas laterais quando cultivados em meios de cultura com diferentes concentrações de BAP (0, 1, 2 e 4 mg/l). A significativa percentagem de regeneração de plântulas (24 %) a partir de meristemas laterais, constituiu um bom indicativo da potencialidade da *T. urvilleana* para multiplicação *in vitro*. A quantidade de plântulas regeneradas foram suficientes para fornecer o material necessário à montagem do banco de germoplasma do CCA/UFSC e à produção de material vegetal para outros experimentos.

Em conjunto com o experimento de multiplicação foi observado que, após 56 dias

cada meristema deu origem a uma nova plântula, sendo necessário o seu subcultivo devido ao esgotamento dos nutrientes do meio de cultura MS.

#### 4.5.4. Experimento de determinação da dominância apical

Em referência a percentagem média de brotações com mais de 1,0 cm, observou-se o efeito significativo a ....%, quanto ao fator tipo de explante. Sendo que os meristemas apical apresentaram os explantes com uma altura média de 4,41 cm, os meristemas basais obtiveram explantes com uma altura média de 2,39 cm, enquanto que os meristemas médios resultaram em explantes com uma altura média de 2,33 cm (Tabela 5).

**Tabela 5. Altura média dos explantes originados de diferentes tipos de explantes: apical, médio e basal aos 45 dias de cultivo em meio MS.**

Tipos de explantes segundo a sua localização na plântula	Altura média das plântulas originadas a partir de diferentes tipos de explante (cm)	DMS (5%)
Apical	4,41	a
Basal	2,39	b
Médio	2,33	b
C.V (%)		78,33

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de DMS a 1 % de probabilidade.

Esses resultados indicaram a necessidade de uma seleção prévia dos tipos de explantes (Apical, Médio ou Basal) na montagem dos experimentos de micropropagação da *T. urvilleana*, para que não ocorram resultados errôneos, devido ao seu maior ou menor vigor de crescimento. Outro aspecto importante foi que, os explantes apicais devem ser utilizados para uma maior taxa de multiplicação da *T. urvilleana in vitro*.

#### 4.5.5. Experimento de viabilidade das Sementes de *Tibouchina urvilleana*.

A percentagem de germinação das sementes de *T. urvilleana* no quinto dia foi de 26 %, ao sexto dia de 53 % e ao décimo segundo dia alcançou os maiores resultados 84 %. A partir do décimo terceiro ocorreu uma grande mortalidade das plântulas já germinadas e uma ausência de germinação das sementes restantes(Tabela 6).

Kraemer *et al.*, (1992) em estudos com a mesma espécie no Rio Grande do Sul,

demonstraram resultados com percentuais entre 92 a 95% de germinação ao sexto dia. Esses resultados diferentes podem ser devido a ocorrência de diferentes fatores dentro da própria espécie *T. urvilleana*, como o estado nutricional das plantas, deficiência de polinização, sementes danificadas durante o processo de secagem, etc.

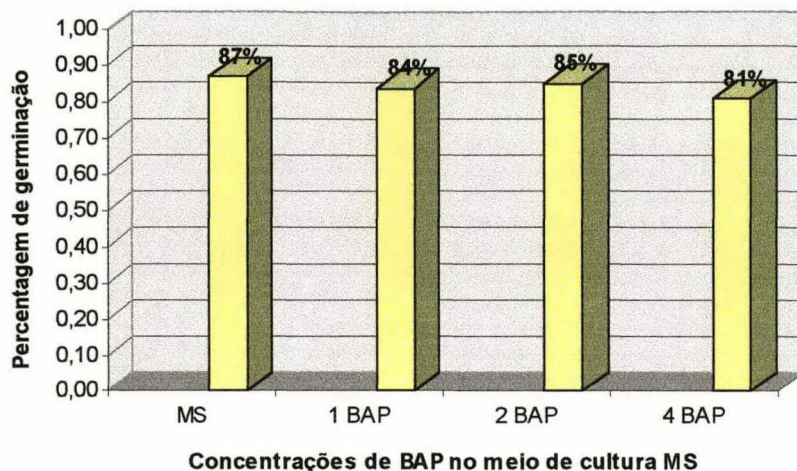
**Tabela 6. Viabilidade das sementes *Tibouchina urvilleana*: Germinação total sob condições controladas (26°C, 16/8 h luz).**

<b>Tempo (dias)</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>Germinação total (%)</b>	26	53	64	80	84

A percentagem de germinação de 84 % das sementes demonstrou o potencial para a introdução de sementes de *T. urvilleana in vitro* para a obtenção de material com a finalidade de produção massal dessa espécie vegetal.

#### **4.5.6. Experimento de Viabilidade de sementes de *T. urvilleana in vitro*.**

O tratamento (0 BAP) teve a percentagem de germinação das sementes de *T. urvilleana* no meio de cultura MS sem adição de BAP foi de 87 %, o tratamento (1 BAP) com uma concentração de BAP 1 mg/l no meio de cultura teve uma percentagem de germinação de 84 %. A concentração de BAP 2 mg/l no meio de cultura sendo o tratamento (2 BAP), apresentou 85 % de germinação, enquanto que com uma concentração de BAP 4 mg/l o tratamento (4 BAP), apresentou uma percentagem de 81% de germinação (Figura 1).



**Figura 1.** Percentagem de germinação de sementes *in vitro* de *Tibouchina urvilleana* aos 12 dias da inoculação em meios de cultura com diferentes concentrações de BAP (0, 1, 2 e 4 mg/l).

A adição de BAP ao meio de cultura com concentrações de até 4 mg/l não promoveu brotações de gemas axilares das plântulas originadas destas sementes. A percentagem de germinabilidade das sementes de *T. urvilleana* diminuiu com o acréscimo da concentração de BAP ao meio de cultura (Figura 1). Cada semente germinada originou uma nova plântula.

#### 4.6. Conclusões

---

1. Uma eficiente assepsia externa dos explantes de *T. urvilleana* pode ser obtida quando os meristemas são lavados em água destilada (200 ml) com 3 ml de detergente, por 20 min, em álcool 70 %, 5 min, em hipoclorito de sódio (QBOA à 40 %) por 20 min, em álcool 70 %, por 5 min e na câmara de fluxo laminar, estes meristemas foram lavados em água + 1 g/l de Benlate autoclavado por 3 vezes, mantendo-os na água da última lavagem (30 min), a adição de fungicida ao processo de desinfestação é essencial para se obter estes níveis de assepsia.

2. Na fase inicial de cultura, a oxidação dos explantes pode ser controlada reduzindo-se em 50 % a concentração de sais do meio de cultura MS.

3. A adição de até uma concentração de 4 mg/l de BAP não promove um aumento do número de brotações das gemas axilares dos meristemas laterais, contudo quando é adicionado 2 mg/l de BAP ocorre um aumento significativo da percentagem média de regeneração de plântulas a partir dos meristemas laterais.

4. Os explantes apicais devem ser selecionados para uma maior taxa de multiplicação de *T. urvilleana in vitro*, já que apresentam uma altura de plântulas maior aos demais proporcionando uma maior taxa de multiplicação.

5. A germinação de sementes de *T. urvilleana* alcança uma percentagem de 84 %, indicando o potencial desta espécie como fonte de material para a inoculação *in vitro* e posterior produção massal.

6. Concentrações de até 4 mg/l de BAP no meio de cultura onde são inoculadas sementes de *T. urvilleana* afetam a sua germinabilidade, contudo não induzem a formação de gemas axilares nas plântulas.

## 7. Considerações finais

*Tibouchina urvilleana* apesar de ser cultivada na Europa desde o início desse século principalmente como planta ornamental, no Brasil ainda não despertou interesse entre os floricultores e até mesmo entre os consumidores, cuja cultura de plantas ornamentais está voltada para espécies exóticas. Embora, recentemente, tenham surgido pesquisas voltadas as espécies ornamentais nativas do Brasil, ao esbarrarem na falta de recursos foram estagnadas. Consequentemente para poucas espécies nativas ornamentais conhece-se a tecnologia de cultivo.

Uma outra dificuldade para a tecnologia de espécies nativas é o direcionamento das pesquisas que em sua maioria não atendem ao consumidor tradicional de plantas ornamentais. Já que a indústria florística necessariamente precisa de um grande número plantas (altas demandas), além de precisar de uma uniformidade, plantas livres de patógenos e com uma alta qualidade. A micropropagação pode servir como instrumento valioso para este propósito.

Futuramente a micropropagação com o auxílio de sistemas controlados automaticamente por computadores, pode ser alternativas interessantes para aumentar a quantidade, a qualidade e a uniformidade das plantas produzidas. Em contra partida reduzindo o seu custo que ainda é muito elevado e torna o processo de micropropagação inviável de algumas espécies vegetais.

Todos esses pontos levantados durante a execução do estágio de conclusão, me ajudaram no entendimento do processo de micropropagação tanto em seu aspecto técnico como em seu potencial socio-econômico. Contribuindo para um futuro ingresso em atividades afins em empresas particulares ou até mesmo na continuação de meus estudos neste ramo da Agronomia.

## 5. Anexos

### Anexos 1.

---

#### Classificação taxonômica:

*Tibouchina urvilleana* (DC.) Cogn. in Mart., **Fl. Bras. 14 (3):358.**  
1885.

**Sinônimos:** *Lasuandra urvilleana* DC., **Prod. 3.** 130. 1828. Tipo. Brasil: Santa Catarina. 1825, *D'Urville* s.n. (lectótipo W; isolectotipo B, fotografias do isolectotipo US F).

*Tibouchina urvilleana* var. *grandulifera* Wurdack, **Sellowia 14:** 122.  
1962. Tipo. Brasil: Santa Catarina. Itajaí. *Klein 882 (US).*

*Tibouchina paulistana* Hoehne, **Anex. Mem. Inst. Butantan 1**  
(15):70. 1922. Tipo. Brasil: São Paulo. São Francisco dos Campos 29  
Dez. 1896, *A. Löfren [CGGSP] 3433* (holotipo SP).

*Tibouchina urceolaris* var. *papillosa* Hoehne, **Anex. Mem. Inst.**  
**Butantan 1 (5): 79.** 1922. Tipo. Brasil: São Paulo. Campinas s.d. (fl.),  
*Campos Novaes* s.n. (holotipo SP 7467).

#### Nomes populares:

Glory Bush, Lasiandra, princess flower. No Rio Grande do Sul é conhecido popularmente como “orelha-de-onça” ou “quaresmeira” (Souza 1984).

#### Descrição morfológicas (conforme Guimarães (1997) :

Arbusto a arvoreta de 1 a 4 metros de altura. Ramos obtuso-quadrangulares, não alados, com tricomas seríceos curtos e esparsos. Folhas pecioladas; pecíolo 0,4 a 0,5 (1,1)



cm comprimento; lâmina 5,5 a 7,2 x 2,6 a 3,3 cm, oblongo-lanceolada, base obtusa, ápice de agudo a obtuso, margem inteira, serícea nas duas faces, nervuras 5 a 7. Inflorescência em panícula terminal de 8 a 11 cm comprimento; flores subsésseis a curto-pediceladas, pedicelo com até 1,5 mm de comprimento. Brácteas ca. 1,4 x 0,8 cm, côncavas, oblongas, ápice obtuso, margem inconspicuamente ciliada, externamente seríceas. Hipanto de 7 a 9 x 4 mm, subgloboso, densamente seríceo, assim como externamente as lacínias. Cálice com tubo muito reduzido, lacínias 5 x 3 mm, lanceoladas, ápice obtuso, margem curtamente ciliada. Pétalas 2,5 a 2,7 x 2,2 cm, roxo-avermelhadas, ápice assimétrico, truncado e apiculado, margem com tricomas curtos. Estames dimorfos; filetes subglabros ou com tricomas glandulares na porção inferior, conectivos bituberculados, filetes dos estames menores ca. 11 mm comprimento, tecas ca. 10 mm comprimento, conectivos ca. 1 mm prolongados; filetes dos estames maiores 13 a 14 mm de comprimento, tecas de 12 a 13 mm de comprimento, conectivos de 2 a 4 mm prolongados. Ovário ca. 8,5 x 4,5 mm; estilete ca. 2,3 cm de comprimento, sigmoidal, com tricomas seríceos na porção inferior. Cápsula ca. 1 x 0,6 cm; sementes ca. 0,5 mm de comprimento, cocleadas.

Esta espécie pode ser reconhecida por apresentar as folhas revestidas por indumento denso-seríceo e pelo conectivo longamente prolongado abaixo das tecas nos estames maiores, este último caráter está mais evidenciado nos exemplares coletados nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Guimarães 1997).

#### **Fenologia:**

A *Tibouchina urvilleana* floresce no Brasil, de setembro a março (Souza 1984; Guimarães 1997). Na Austrália (do verão, passando pelo outono até o começo do inverno), na Itália no meses de Agosto, Setembro e Outubro (Internet 1998)

#### **Quantidade de Sementes por Quilograma:**

Calcula-se que em um quilograma encontrem-se cerca de 43,5 milhões de sementes (Kraemer *et al.* 1992).

#### **Tipo de solo:**

Arenoso a franco argiloso, solo ácido.

#### **Região de distribuição da *Tibouchina urvilleana*:**

No Brasil, *Tibouchina urvilleana* foi coletada em vegetação litorânea, nos estados: do Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (Guimarães 1997).

Em outros países foi introduzida pelas potencialidades ornamentais e de fixadora de dunas a *T. urvilleana*, é cultivada ocorre na Austrália onde ocorre nas zonas das cidades de Adelaide, Brisbane, Melbourne, Perth, Sydney e nos margens dos rios. Nos Estados Unidos (Flórida) é uma das plantas ornamentais preferidas, isso é devido principalmente pelo verde intenso das folhas e por suas flores atrativas. Nas Ilhas do Hawai ocorre na Grande Ilha, Kauai, Oahu e Maui (Internet 1998).

## 6. Referenciais Bibliográficas

- AMATO, F.D. 1977. **Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures.** In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S., (Eds.). **Plant cell, tissue and organ culture.** Berlin: Springer-Verlag, 343-357.
- AUGÉ, R.; BOCCON-GIBOD, J.; BEAUCHESNE, G.; DECOURTYE, L.; DIGAT, B.; JALOUZOT, R.; MINIER, R.; MORAND, J-CL.; REYNOIRD, J.P; STRULLU, D.G.; VIDALIE, H. 1989. **La culture *in vitro* et ses applications horticoles.** 3<sup>a</sup> ed. Lavoisier. 225.
- BIASI, L.A.; KOLLER, O.C. & KÄMPF, A. N. 1994. Micropropagação do abacateiro 'Ouro verde' a partir de segmentos nodais. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, (29) 7:1051-1058.
- BOCCON-GIBOD, J. 1989 a. Les besoins nutritifs des tissus cultivés en conditions aseptiques. 31-35. In: AUGÉ, R.; BOCCON-GIBOD, J.; BEAUCHESNE, G.; DECOURTYE, L.; DIGAT, B.; JALOUZOT, R.; MINIER, R.; MORAND, J-CL.; REYNOIRD, J.P; STRULLU, D.G.; VIDALIE, H. 1989. **La culture *in vitro* et ses applications horticoles.** 3<sup>a</sup> ed. Lavoisier. 225.
- BOCCON-GIBOD, J. 1989 b. La technologie de la culture in vitro. 37-62. In: AUGÉ, R.; BOCCON-GIBOD, J.; BEAUCHESNE, G.; DECOURTYE, L.; DIGAT, B.; JALOUZOT, R.; MINIER, R.; MORAND, J-CL.; REYNOIRD, J.P; STRULLU, D.G.; VIDALIE, H. 1989. **La culture *in vitro* et ses applications horticoles.** 3<sup>a</sup> ed. Lavoisier. 225.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, H.E.; 1990. **Meios nutritivos.** In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. 1990. **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de**

plantas. Brasília. ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 37-70.

- CASTRO, O.F.A. & ANDRADE, A.G. 1995. Cultura *in vitro* de meristemas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) LAM.) **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, 30 (7): 917-922.
- CASSELLS, A.C.; CARNEY, B.F.; MCCARTHY, E.; MCHUGH, A.; HARMEY, M. A.; 1988. Problem posed by cultivable bacteroid endophytes in the establishment of axenic cultures of *Pelargonium x domenticum*: the use of xanthomonas perlagonii-specific Elisa, DNA probes and cultures indescending in the screening of antibiotic treated and untreated donor plants. **Acta horticulturae**, 225: 153-161.
- CORDAZZO, C.V. & SEELINGER, U. 1995. **Guia ilustrado da vegetação costeira do extremo sul do Brasil**. Editora FURG. Rio Grande, Brasil. 2ª ed. 275.
- DEBERGH, P.C. & MAENE, L.T. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.14, 335-345.
- DEBERGH, P.C. & READ, P.E. 1991. **Micropropagation**. In: Micropropagation technology and application. Debergh, P.C. & Zimmermann, R.H. (eds.), Kluwer Academic Publishers., Dordrecht, 3-13.
- GEORGE, F.E.; 1993. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 2ª ed. British library. Great Britain. 574 .
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y.; 1983. **Handbook of plant cell culture: Techniques for propagation and Breeding**. v. 2. 970.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. L. 1994. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Ed. e Gráf. Universitária - UFPEL, Pelotas, Brasil.
- FERRI, V.G. 1985. **Fisiologia vegetal**. 2ª ed. rev. atual. São Paulo: EPU, v.2, 401.
- FLICK, C.F; EVANS, D.A. & SHARP, W.R. 1983. **Organogenesis**. v.1. 82-123. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y.; 1983. **Handbook of plant cell culture: Techniques for propagation and Breeding**. v. 1. 970.
- FORTES, G.R.de L.; 1992. **Calogênese e Organogênese *in vitro* de Macieira (*Malus spp.*) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos**. Viçosa. UFV. 163. (Tese de mestrado).

- GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D.1934. **Plant propagation by tissue culture.** Basingstoke, Exegetics. 709.
- GRATTAGAGLIA, B & MACHADO, M. A. 1990. **Micropropagação** In: TORRES,A. C. & CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. ABCTP/EMBRAPA - CNPH, Brasília, 433.
- GUERRA, M.P. 1994. **Controle da morfogênese *in vitro* e suas aplicações na agricultura.** Fotocópia. UFSC. 14.
- GUIMARÃES, P.J.F. 1997. **Estudos taxonômicos de *Tibouchina* sect. *Pleroma* (D.Don) Cogn. (Melastomataceae).** Universidade Estadual de Campinas. Tese de Doutorado. Campinas. Foram Paulo. 155 -158.
- HABERLANDT, 1902. In: ROCA, W. M. & MROGINSKI, L.A. 1991. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamento y aplicaciones.** CIAT, Cali, Colômbia, 970 .
- HANDRO, W.; & FLOH, E.I.S. 1990. **A organização de um laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas.** In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. 1990.Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de plantas. Brasília. ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 43-70.
- HEITZ, H. 1986. Alswar's ein Stuck won sonnigen Suden: Mein Shoner Garten (Berlin) 15(4): 134-141.
- INTERNET. 1998. Informações retiradas em consulta pelas ferramentas de busca nos seguintes endereços: <http://www.gardeninfo.com/oz/shrusbs/2043.html>
- KRAEMER, K.H.; KAMPF, A.N.;AQUILA, M.E.A. 1992. Viabilidade das sementes de *Tibouchina urvilleana* (DC.) Cogn. (Melastomataceae). Turrialba, S. José, V.42, Nº 3, 371-374.
- KRIKORIAN, A.D. 1991. **Propagación clonal *in vitro*.** In: ROCA, W. M. & MROGINSKI, L.A. 1991 **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamento y aplicaciones.** CIAT, Cali, Colômbia, 970 .
- KÖCHEL,C. & KÖCHEL, M. 1987. **Die Schonsten Kubelpflanzen.** Munique, Verlag. 119-120.
- LABOURIAU, L.G. 1983. Die schonstern Kubelpflanzen. Munique, Verlag, 119-120.
- LEIFERT, C.; WAITES, W.M.; 1992. Bacterial growth in plant tissue culture media. **J. of Appl. Bact.** 72(6): 460-466.

- MOREL, G.M. 1960. Producing virus-free cymbidiums. **Am. Orchid. Soc. Bull.**, 29: 495-497p.
- MOREL, G.M. & MARTIN. 1958.
- MURASHIGE, T.E. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 15 (3): 473-497.
- MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. **Ann. Rev. Plant. Phys.**, 25: 135-166.
- WURDACK, J.J. 1962. Melastomataceae of Santa Catarina. **Sellowia**. (14): 121- 122.
- WERNER, E.M. & BOE, A.A. 1980. In vitro propagation of malling 7 apple rootstocks. **HortScience**, Alexandria, 15 (4): 509-510.
- REITZ, R. 1961. Vegetação da zona marítima de Santa Catarina. **Sellowia**. (13): 63-65.
- REINERT, J. 1959. Über die Kontrolle die Morphogenese und die Induktion von Advetiveembryonem an gewebeulturen aus karotten. **Planta**, (53): 318-333.
- ROCA, W. M. & MROGINSKI, L.A. 1991 **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamento y aplicaciones**. CIAT, Cali, Colômbia, 970.
- SANTIAGO, A. 1996. Gestão Comunitária de Recursos Renováveis em Ecossistemas Litorâneos: Avaliação da Experiência Brasileira. In: **Anais da 3ª Reunião Especial da SBPC. EDEME**. Florianópolis, SC. 140-141.
- SCHULTHEIS, J.R. *et al.* 1990. **Embriões somáticos e sementes sintéticas**. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. 1990. **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de plantas**. Brasília. ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 433.
- SOUZA, M.L.D.R. 1984. **Estudo taxonômico do gênero *Tibouchina* Aubl. (Melastomataceae) no Rio Grande do Sul**. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas-Botânica Sistemática. UFRGS, Porto Alegre. 153.
- SKOOG, F & MILLER, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symp. Soc. for Exp. Biol.**, (11): 118-131.
- STEWART, F.C.; MAPES, M.O.; MEARS, K. 1958. Growth and organized development of cultured carrots. II. Organization in cultures from freely suspended cells. **Amer. Jour. Bot.**, (454): 705-708.
- TORRES, A.C., & CALDAS, L.S. 1990. **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de plantas**. Brasília. ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 433.

VAZ, R.L.1986. Cultura de tecidos: potencial e aplicação. In: Simpósio Nacional de Cultura de Tecidos Vegetais, 1., 1985, Brasília. **Anais... Brasília: EMBRAPA-DDT, 9-10.**

VILLALOBOS, V.M.; THORPE, T.A. 1991. **Micropropagación: conceptos, metodología y resultados.** In: ROCA, W.M. & MROGINSKI, L.A. 1991 **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamento y aplicaciones.** Cali, Colômbia: CIAT, 970.

ZONTA, E.P. & MACHADO, A.A. 1989. SANEST - Sistema de análise estatística. Campinas: **Instituto Agronômico de Campinas.**



**Figura 2. Local de coleta das plantas matrizes e o seu estabelecimento em cultivo.**

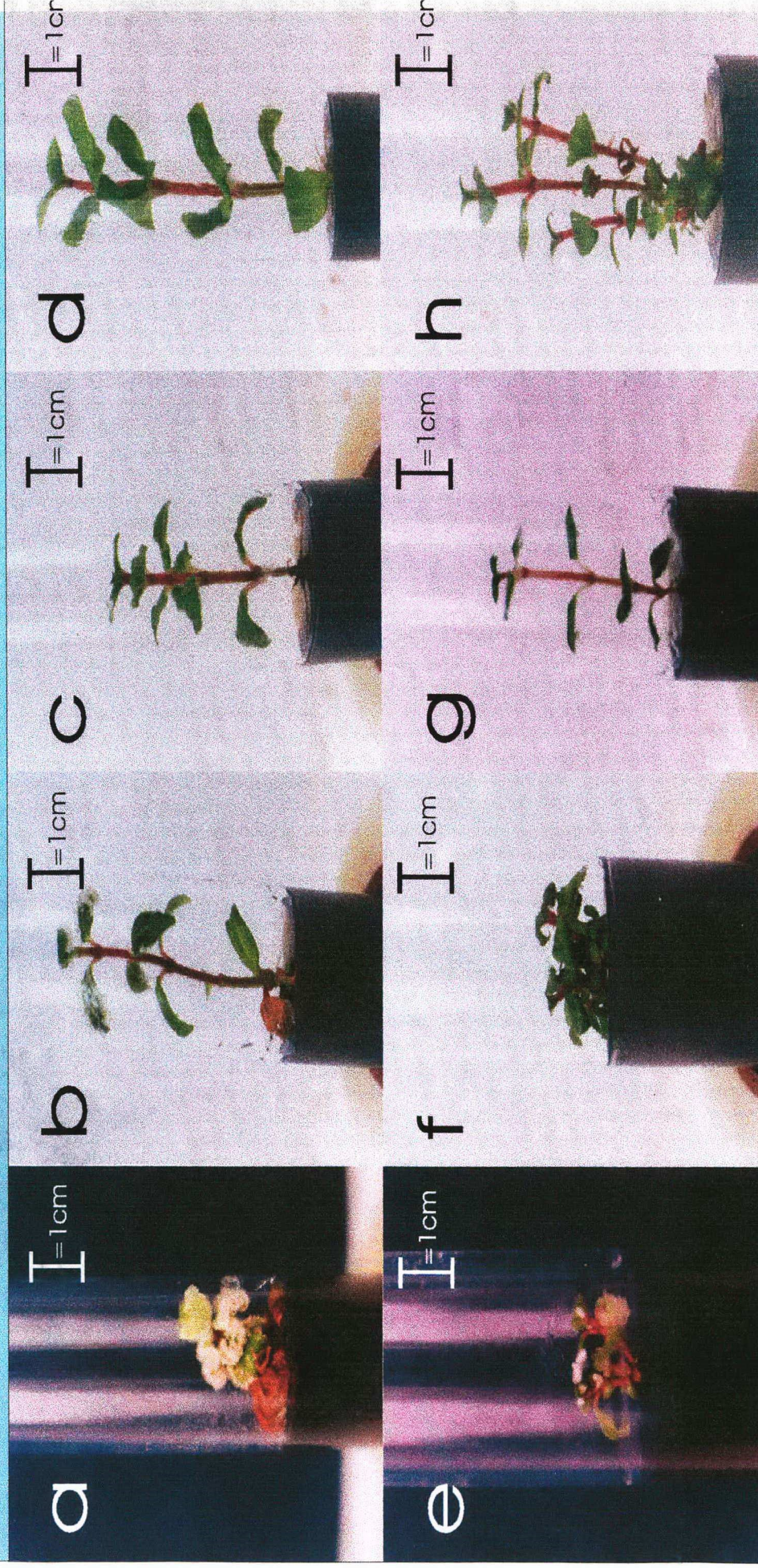


**Siglas:**

- a = Duna móvel da Joaquina, local de coleta das estacas herbáceas para a formação de um banco de plantas matrizes.
- b = Planta de *T. urvilleana* utilizada para a coleta das estacas herbáceas para a formação de um banco de plantas matrizes.
- c = Detalhe da flor da *T. urvilleana* encontrada nas dunas móveis.
- d,f = Alojamento das plantas matrizes de *T. urvilleana* dentro da casa-de-vegetação utilizadas como fonte de meristemas para os experimentos.
- e = Detalhe do acondicionamento em vaso de uma planta matriz de *T. urvilleana*.



## Comportamento da *T. urvilleana* (DC) Cong. *in vitro*.



### Siglas:

a = Plântula com 56 dias da inoculação em meio de cultura MS, com calos nas folhas.

b,c,d = Plântulas com 56 dias da inoculação em meio de cultura inicial MS.

e = Plântula com 14 dias da inoculação em meio de cultura MS, com calos nas folhas.

f,g,h = Plântulas com 28 dias da inoculação em meio de cultura MS.